

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ALFRED BOQUET

(1879-1947)

Alfred Boquet, chef du service des recherches sur les bacilles tuberculeux virulents, secrétaire général de ces *Annales*, est, de l'équipe pastoriennne qui a aidé Albert Calmette dans ses travaux à l'Institut Pasteur de Paris, le premier dont nous ayons à déplorer la perte. Au moment de sa retraite, après quarante-cinq années d'activité d'abord en Algérie, puis à Paris, il a été emporté par un mal soudain et implacable dont les nombreux médecins, parents et amis, appelés à son chevet ont été impuissants à enrayer le développement.

Lié à lui par trente-sept années de travail en commun et d'amitié fraternelle, j'ai le pieux devoir de lui adresser ce dernier adieu dans cette Revue où nos deux noms ont si souvent paru côté à côté et où il avait succédé à Calmette comme secrétaire général.

Orphelin de père et de mère à quatorze ans, A. Boquet avait été obligé, pour terminer ses classes au lycée de Beauvais, de vivre sur les modestes économies que ses parents lui avaient laissées. Pressé de trouver rapidement une situation, il renonça à devenir médecin comme il l'avait souhaité, et fit ses études à l'Ecole nationale vétérinaire de Toulouse. Dès qu'elles furent terminées, il prit un poste de vétérinaire sanitaire dans le Sud Algérien. Il était chargé d'assurer, dans un vaste secteur, la protection du cheptel contre les maladies infectieuses et en particu-

lier du troupeau ovin contre la clavelée. On ne pouvait opposer à cette affection que la clavelisation avec le danger des accidents qu'elle provoquait et l'inconvénient qu'elle avait d'entretenir l'existence du virus de cette maladie.

Albert Calmette, qui avait été appelé à organiser le nouvel Institut d'Algérie, et Ed. Sergent qui allait en prendre la direction, firent appel pour le service vétérinaire chargé de la lutte contre la clavelée, à J. Bridré de l'Institut Pasteur de Paris, auquel fut adjoint Boquet à cause des connaissances qu'il avait acquises sur cette affection. Leurs efforts conjugués leur permirent, en s'inspirant des travaux de Besredka, de mettre au point une nouvelle méthode de vaccination par le virus sensibilisé au moyen du sérum antyclaveleux de Borrel. Cette méthode, inoffensive et aussi efficace que la clavelisation, s'est substituée à cette dernière et a permis de vacciner des dizaines de millions de moutons contre la clavelée en Afrique du Nord, en France, en Italie et en Espagne.

Dans les heures de liberté que lui laissaient les obligations de son service pratique, Boquet venait souvent me trouver dans mon laboratoire où j'étais chargé des analyses médicales, car avec la puissance de travail qui l'a toujours caractérisé, il s'était mis avec passion à compléter les notions de bactériologie qu'il avait acquises à l'Ecole de Toulouse sous la direction de Leclainche et de Vallée.

Nous fûmes ainsi conduits à entreprendre ensemble des recherches sur la lymphangite épidémique des Solipèdes, cette curieuse affection qui sévit en Afrique du Nord sur le cheval et le mulet, déterminant des pertes très importantes. Rivolta avait décrit son agent sous le nom de *Cryptococcus farciminosus* sans réussir à le cultiver. Marcone et Tokishige, en 1895 et 1896, avaient assisté à un premier développement de ce parasite sur les milieux artificiels sans pouvoir en obtenir des réensemencements. Personne n'avait donc encore réalisé la culture du Cryptocoque, si bien que certains auteurs doutaient de sa nature mycosique. Les recherches poursuivies pendant plusieurs années par A. Boquet et son collaborateur, ont permis, par l'ensemencement en masse de pus sur gélose Sabouraud à 35°, d'obtenir des cultures de ce champignon repiquables en série, d'en décrire les formes d'évolution, de reproduire la maladie par inoculation de sa culture au cheval et d'instituer un traitement spécifique de cette affection par des injections répétées de cultures tuées de Cryptocoques, méthode qui est devenue d'un emploi courant. Toutes ces recherches ont été résumées dans une monographie sur la lymphangite épidémique des Solipèdes.

Dégagé de toute obligation militaire, Boquet jugea, en 1915, qu'il était de son devoir de s'engager dans l'armée d'Orient où il servit comme vétérinaire auxiliaire, puis aide-major. Il en revint

éprouvé par les fatigues qu'il avait endurées dans les opérations militaires en Serbie et par le travail qu'il avait fourni à Salonique au laboratoire de prophylaxie de la peste qui dépendait du laboratoire de l'armée dirigé par le Dr Armand-Delille.

Dès la démobilisation de Boquet en 1919, Calmette, qui venait d'être nommé sous-directeur de l'Institut Pasteur de Paris, le désigna avec L. Nègre comme chefs de son laboratoire et confia à ses deux collaborateurs la mission de poursuivre l'étude du B. C. G. dont, avec Guérin, il avait obtenu la perte complète de virulence par culture sur pomme de terre glycinéée à la bile de bœuf et dont il avait montré les propriétés immunisantes chez les bovidés.

Les recherches de A. Boquet avec A. Calmette et L. Nègre ont contribué à établir la disparition du pouvoir pathogène du BCG pour les animaux de laboratoire et à démontrer ses propriétés antigéniques, sensibilisantes à la tuberculine et son pouvoir immunisant vis-à-vis de la tuberculose du cobaye et du lapin.

Malgré les nombreuses attaques dont le BCG a été l'objet jusqu'à ces dernières années, tous les faits mis en évidence par ces travaux ont été reconnus exacts par les médecins français et étrangers qui ont été appelés à les contrôler et ont contribué à édifier le BCG sur une base expérimentale solide.

Dans la suite, Boquet a été associé aux premiers essais de vaccination des nouveau-nés par le BCG effectués par A. Calmette, C. Guérin, B. Weill-Hallé, R. Turpin et L. Nègre et a préparé avec ce dernier le vaccin BCG jusqu'à l'arrivée de Guérin à l'Institut Pasteur de Paris, en 1928.

Dans la période qui s'est écoulée de 1919 à 1931, Boquet avait déjà commencé à entreprendre, seul ou aidé par J. Valtis, puis par A. Saenz, diverses recherches sur le bacille de Koch et sa culture, sur la dispersion des bacilles tuberculeux dans l'organisme des animaux expérimentalement infectés, sur la tuberculose du rat et de la souris et sur les relations entre l'allergie et l'immunité (avec L. Nègre).

Mais, pendant ces années, ses efforts se sont surtout portés avec ce dernier sur l'étude des propriétés biologiques des divers composants du bacille de Koch. Ces recherches ont montré qu'en présence d'un sérum antituberculeux, les extraits méthyliques de bacilles de Koch, préalablement traités par l'acétone, ont un pouvoir fixateur élevé de l'alexine. Plus tard, Macheboeuf a établi que ce dernier est dû à un mélange d'acides phosphatidiques à l'état de sels d'ammonium, de sodium et de magnésium.

Sous le nom d'antigène méthylique, cet extrait est couramment employé dans les laboratoires pour déceler et titrer les anticorps tuberculeux. L'expérience ayant prouvé qu'il est capable de ralentir la marche de l'infection chez le cobaye et le lapin, l'emploi

de l'antigène méthylique a été étendu au traitement de certaines formes de la tuberculose humaine dans lesquelles il est couramment employé.

Lorsque A. Calmette prit possession, en juin 1931, des nouveaux bâtiments de la tuberculose, il confia à Boquet la direction du service de recherches sur les bacilles virulents, alors que C. Guérin conservait celle des services pratiques du BCG et L. Nègre se voyait attribuer le service de recherches sur la vaccination antituberculeuse et de contrôle du BCG.

A partir de cette date et jusqu'aux derniers jours qui ont précédé sa mort, Boquet n'a pas cessé de se consacrer avec de nombreux collaborateurs tels que J. Bretey, R. Broca, A. de Grolier, R. Laporte, A. Saenz, W. Schaefer, J. Sandor et J. Valtis, à des recherches sans cesse renouvelées, sur le bacille de Koch, sa culture, les procédés de détermination des types bacillaires, les tuberculines, l'infection et la surinfection expérimentales et les rapports de l'hypersensibilité et de l'immunité.

Pour la détermination des types bacillaires, il a proposé l'inoculation intraméningée avec R. Broca et l'inoculation intra-pleurale au lapin avec R. Laporte. Avec le premier de ces auteurs, il a fait une étude sur la méningite expérimentale provoquée par l'inoculation sous-occipitale, et avec le second, il a effectué des recherches sur la pleurésie expérimentale chez le lapin, le cobaye et le singe et sur les tuberculoses osseuses et ostéo-articulaires chez le lapin. La valeur réactionnelle des tuberculines obtenues à partir de cultures en milieu synthétique (avec J. Bretey) et la préparation de tuberculines purifiées, en particulier de la tuberculine dite « phosphotungstique » (avec G. Sandor), ont très longuement retenu son attention, ainsi que le mécanisme de l'infection et des surinfections bacillaires expérimentales, leur genèse, leurs caractères, leur mesure et leur rôle dans le développement de l'infection bacillaire. Il a montré comment, au fur et à mesure qu'elle progresse parallèlement à l'infection tuberculeuse, l'immunité ralentit la dispersion des germes d'épreuve, tend à les fixer et à les détruire au lieu même de la réinoculation et à modifier l'évolution des lésions locales de surinfection. Enfin, avec L. Nègre, il a établi que la réactivité à la tuberculine et la résistance aux surinfections correspondent à deux aptitudes concomitantes, solidaires dans leur développement au cours de la tuberculose et cependant dissociables dans certaines conditions expérimentales.

Sa compétence sur ces matières était universellement reconnue.

Tout en poursuivant toutes ces recherches, Boquet a cherché à éviter une spécialisation trop étroite en étendant ses travaux à d'autres maladies contagieuses des animaux et de l'homme telles que la pseudo-tuberculose des rongeurs et la peste humaine, la lymphangite ulcéruse des Solipèdes, l'entérite paratuberculeuse

des Bovidés et en particulier le charbon bactéridien qui le rameait dans le champ des infections aiguës.

En dehors de toutes ces recherches menées souvent de front, A. Boquet avait à se consacrer à la direction de nombreux travailleurs français et étrangers qui se succédaient dans son service et à la rédaction des ouvrages didactiques auxquels il a été associé : Eléments de microbiologie générale et d'immunologie, avec M. Nicolle ; Manuel de technique de microbiologie et sérologie, avec A. Calmette et L. Nègre, dont la quatrième édition est en cours de préparation, avec J. Bretey ; la Vaccination antituberculeuse par le BCG, avec A. Calmette, C. Guérin, L. Nègre ; Traitement de la tuberculose par l'antigène méthylique, avec L. Nègre ; les troisième et quatrième éditions de l'Infection bacillaire et la tuberculose, avec A. Calmette et L. Nègre ; le volume de la Tuberculose dans l'Encyclopédie médico-chirurgicale, avec L. Nègre.

Il avait aussi à assurer le secrétariat général de ces *Annales*. Tous ceux qui étaient en relations avec lui pour les mémoires à publier savent avec quelle régularité et quel soin scrupuleux il s'en occupait.

Sa vie scientifique est avant tout caractérisée par la persévérance que, suivant l'exemple de son maître Calmette, il a montrée dans l'effort. Il s'est attaché à de grandes questions comme la clavelée, la lymphangite épidéotique, la tuberculose et dans chacune d'elles il a accompli avec divers collaborateurs une œuvre originale.

L'esprit toujours en éveil sur toutes les acquisitions nouvelles de nos connaissances, il consacrait chaque jour de grand matin plusieurs heures à la lecture avant de rejoindre son laboratoire. Sa prodigieuse mémoire et l'intérêt de sa conversation nourrie de faits précis sur les sujets les plus divers lui ont conquis l'admiration de ses élèves et l'estime et l'amitié d'hommes tels que Jules Bordet, Maurice Nicolle et G. Ramon.

Officier de la Légion d'honneur, membre de nombreuses sociétés scientifiques françaises et étrangères, récemment élu membre de l'Académie de Médecine dans la section vétérinaire, Boquet a conservé jusqu'à la fin la modestie qui l'a toujours caractérisé.

Après le bonheur qu'il avait dans son foyer, il a toujours trouvé ses plus grandes joies dans les recherches qu'il poursuivait dans son laboratoire et qu'il était heureux de continuer malgré sa retraite.

Nous adressons à Madame Boquet, qui a si courageusement soutenu son mari dans sa vie de travail, et au ménage de son fils notre collègue Paul Boquet, qui perd en lui non seulement un père tendrement aimé, mais un guide et un soutien précieux, l'expression de notre profonde sympathie et du fidèle souvenir que nous garderons de notre regretté collègue.

M. A. TRILLAT

(1861-1944)

Trillat était un des plus anciens membres de l'Institut Pasteur, où il entra en 1901. Il s'est éteint dans sa retraite en Afrique du Nord, loin de nous, alors que les nouvelles ne parvenaient plus à Paris.

Son œuvre fut féconde, tant du point de vue théorique que du point de vue pratique. Chimiste de haute valeur et analyste habile, il savait guider ses recherches vers des applications fructueuses, car il était doué d'un remarquable génie pratique. Il le devait probablement à ses débuts dans l'industrie, puis à son long travail dans des pays étrangers où l'usine et le laboratoire de recherches sont en contact très intime.

Son coup d'essai fut un coup de maître qui marqua profondément la suite de son œuvre. Il était âgé seulement de vingt-trois ans lorsqu'on lui confia la mise au point de la préparation industrielle d'aldéhyde formique. Il fallut vaincre de grandes difficultés techniques, les rendements étaient alors mauvais, Trillat les améliora, puis en 1888, faisant œuvre de précurseur dans le domaine de la catalyse industrielle, il découvrit un perfectionnement considérable qui lui permit d'obtenir, avec un rendement excellent, cette solution aqueuse concentrée de produits de polymérisation de l'aldéhyde qu'il appela « formol » pour la différencier de l'aldéhyde pur.

Il eut ainsi le privilège de posséder à discréter une substance très peu connue des chimistes à cette époque, il put l'étudier à loisir et sut en trouver de splendides applications dans des domaines très divers. Il découvrit le pouvoir antiseptique du formol et sut mettre au point son application pratique à la désinfection. Ceci eut suffi à rendre célèbre le nom de Trillat, car le service rendu à l'hygiène était considérable. Mais Trillat ne limitait pas ses essais à un seul domaine, il ne se satisfaisait pas d'un seul succès pratique, il savait fouiller dans des directions très diverses. Il découvrit bientôt l'action coagulante du formol sur les protéines et l'appliqua aussitôt à la conservation et au durcissement des pièces anatomiques, puis à la fabrication d'objets en caséine formolée (1893), bien connue depuis lors sous le nom de galalithe. Il fut ainsi le grand précurseur de l'industrie des matières plastiques dont le développement actuel est immense. Dans ce

domaine, il fut aussi le précurseur pour une autre matière célèbre : la bakélite, car dès 1894, donc avant Bakeland, il découvrit que le formol pouvait se combiner avec les phénols pour donner des matières résinoïdes.

Poursuivant toujours ses recherches sur le formol, Trillat trouva encore de belles applications à la Science pure, à l'industrie, à la médecine même. Je citerai seulement quelques exemples : découverte de matières colorantes nouvelles ; découverte d'une méthode générale de synthèse des acétals méthyléniques ; découverte des propriétés diurétiques de l'examéthylénététramine (urotropine).

L'étude du formol et de ses dérivés représente la partie principale de l'œuvre de Trillat. Cependant, ce travailleur ardent ne se limita pas à cette œuvre maîtresse ; il aborda avec succès des domaines divers de la Science et de ses applications.

La protection des métaux légers contre la corrosion l'intéressa, des aldéhydes autres que le formol attirèrent son attention ; il mit au point, par exemple, une intéressante méthode de fabrication de l'aldéhyde acétique.

L'ambiance pastorienne conduisit souvent Trillat à des recherches bactériologiques. Il étudia tout particulièrement le rôle des poussières et des bacilles dans la transmission des épidémies et, là encore, son œuvre fut féconde.

De nombreux honneurs le récompensèrent justement : il fut membre du Conseil Supérieur d'Hygiène, Conseiller Scientifique de la Marine, puis Membre de l'Académie de Médecine (1937) et Commandeur de la Légion d'honneur.

M. MACHEBOEUF.

PAUL JEANTET

(1870-1947)

L'Institut Pasteur et les *Annales de l'Institut Pasteur* ont fait une très lourde perte en celle de Paul Jeantet, chef du Service de Microphotographie qu'il dirigeait depuis près de quarante ans avec une compétence et un dévouement à toute épreuve.

Les services rendus à la bactériologie par notre collègue furent très grands ; il consacra sa vie à son laboratoire. Par goût et par inclination, il était astronome, ou du moins, il aimait l'astronomie. Il avait été initié à l'astronomie descriptive, dès sa toute première jeunesse, par Quenisset, qui s'occupait de météorologie à l'observatoire de Camille Flammarion. Avec ces Maîtres, il avait fait des photographies de nuages qui servirent plus tard à leur classification. P. Jeantet se passionna alors pour la littérature de Camille Flammarion et tout ce qui avait trait à la vulgarisation scientifique. Pour satisfaire sa curiosité, il entra comme employé dans une grande librairie.

Quelques années plus tard, l'Institut Pasteur de la rue Dutot s'agrandissait du bâtiment nouveau de Chimie biologique. La bibliothèque de ce nouvel Institut fut confiée au Dr Buret, microphotographe de l'Institut. Comme le Dr Buret s'absentait quatre mois par an pour exercer la médecine dans une ville d'eaux, force fut de lui adjoindre un aide bibliothécaire. Celui-ci fut Paul Jeantet, qui eut la joie de remplacer aussi le Dr Buret comme photographe. Certes, il n'était nullement préparé à la microphotographie. Il se mit à l'étude en reportant, sur le microscope, tout l'amour qu'il avait pour le télescope. Tout lui était étranger dans la science de la bactériologie. Aussi, voulant acquérir les notions indispensables à ses nouvelles fonctions, il suivit le cours de Bactériologie de l'Institut Pasteur.

Le hasard du voisinage du laboratoire de photographie de P. Jeantet avec le service de Physique de Jacques Duclaux fit naître, entre eux, une collaboration à laquelle P. Jeantet apporta tout son esprit aussi adroit qu'inventif d'autodidacte de la science. De cette collaboration résulta une série de travaux signés par J. Duclaux et P. Jeantet qui font époque en actinologie. Parmi ceux-ci, il faut noter la description d'un *spectrographe à prisme d'eau pour l'ultraviolet*. La construction de cet appareil impro-

visé par P. Jeantet avec des matériaux de fortune avait coûté 25 francs ! Il a fallu des années de travail de nombreux physiciens français et étrangers pour établir un appareil plus perfectionné qui apporta peu de progrès aux questions étudiées.

J. Duclaux et P. Jeantet publièrent de nombreux travaux sur les *Plaques photographiques pour l'ultraviolet extrême* ; le *Spectre d'absorption de l'oxygène* ; la *Dispersion de l'eau dans l'ultraviolet* ; la *Limitation du spectre solaire ultraviolet* ; les *Méthodes de spectrographie pour l'ultraviolet* ; la *Mesure du pouvoir rotatoire du quartz dans l'ultraviolet*.

Les *plaques photographiques pour l'ultraviolet* conçues par les deux collaborateurs sont encore utilisées, actuellement, dans le monde entier.

L'œuvre de P. Jeantet en microphotographie est considérable. Au moment de la réédition d'un livre sur *Les Microbes*, écrit par le Dr Charpentier, de l'Institut Pasteur, P. Jeantet se chargea d'illustrer ce travail. Il en résulta un véritable *Atlas photographique de Microbiologie*. Combinant les éclairages verticaux et obliques, P. Jeantet arriva à faire ressortir, sur les clichés, le relief des microbes et d'en faire des images stéréoscopiques. La plus surprenante est celle des *Bacterium aceti* qui se présente avec des apparences de fruits d'arachide.

La collection de clichés accumulés par P. Jeantet est un trésor incomparable. P. Jeantet vécut, avec tous les bactériologistes de l'Institut Pasteur, toutes les étapes de la Microbiologie de son temps. Avec Dujardin-Beaumetz, Borrel et Jouan, il photographia les premières colonies du microbe de la *Péripneumonie des bovidés*.

Il fit également les premières photographies du *Tréponème de la syphilis* aperçu dans les chancres expérimentaux provoqués chez le chimpanzé, par Metchnikoff et Roux. Il photographia aussi les premières *plages de bactériophage* obtenues par d'Hérelle dans le laboratoire de Salimbeni. Ses derniers clichés sont ceux qu'il publia avec Lépine, représentant les *cristaux de Stanley* de la *Mosaïque du tabac* agrandis par le microscope électronique.

La collection des clichés de P. Jeantet comporte non seulement des images de microbes, mais encore un nombre très grand de reproductions de coupes anatomo-pathologiques se rapportant à la Bactériologie. Il mettait sa série de *positifs* à la disposition de tous ses collègues qui les utilisaient pour faire des projections au cours de conférences. Ses documents comportent aussi une série d'images ayant trait à la vie de Pasteur : photographies de sites et demeures où il avait vécu et séjourné, reproductions de ses instruments de travail, reproductions aussi d'un grand nombre de portraits que Pasteur fit pendant son enfance et sa jeunesse. Tout ce qui avait pu être fixé par la photographie ayant trait à

Pasteur et à l'Institut Pasteur fut réalisé, avec amour, par P. Jeantet.

P. Jeantet laisse dans la mémoire de tous ceux qui l'ont connu et qui ont profité de son érudition graphique, le souvenir d'un collègue, d'un camarade, d'un ami qui savait prodiguer à tous son expérience et son affection.

E. POZERSKI.

ÉTUDE SUR LE POLYOSIDE O DU BACILLE TYPHIQUE ET PRÉPARATION D'UN SÉRUM DE LAPIN SPÉCIFIQUE DE CE POLYOSIDE

par PIERRE GRABAR et JACQUES OUDIN (*).

(*Institut Pasteur, Service de Chimie microbienne.*)

L'un de nous, étudiant avec Hornus [6, 8, 9], au moyen des techniques quantitatives de l'immuno-chimie, l'antigène somatique O extrait d'une souche de bacilles typhiques (O-901) selon la méthode décrite par Boivin et Mesrobeau [2], ont montré que le glucide qui reste en solution après hydrolyse acide de cet antigène ne précipitait, dans un sérum préparé par injection de bacilles typhiques ou d'antigène O, qu'une partie des anticorps précipitables par l'antigène complet.

On pourrait donc diviser les anticorps spécifiques de cet antigène en deux catégories : ceux qui sont précipitables par le glucide soluble après hydrolyse acétique et ceux qui ne le sont pas.

Il est très facile, comme on vient de le voir, d'isoler les anticorps de la deuxième catégorie ; il est beaucoup moins facile d'isoler les anticorps de la première catégorie et d'obtenir, en d'autres termes, un sérum qui contienne les anticorps précipitables par le glucide soluble après hydrolyse à l'exclusion des autres anticorps O.

Il a été longtemps admis, en effet, qu'une substance purement glucidique, quoique souvent capable de précipiter avec les anticorps spécifiques, n'était jamais antigénique. Cette opinion dut être révisée et certains polyosides bactériens se montrent antigéniques au moins pour certaines espèces animales : le polyoside du pneumocoque (type I) pour la souris lorsqu'il est préparé de manière à conserver ses groupements acétylés, d'après les travaux de Pappenheimer et Enders [11], Enders et Wu [3] entre autres ; les polyosides du pneumocoque pour l'homme au point qu'ils servent aujourd'hui, grâce aux travaux de Heidelberger et de ses collaborateurs [7], à la vaccination anti-

(*) Société de Microbiologie, séance du 9 janvier 1947.

pneumococcique et que leur injection provoque même chez l'homme la formation d'anticorps précipitants en quantité dosable.

Pourtant, ce pouvoir antigénique des polyosides pneumococciques, constaté chez la souris et chez l'homme, ne semble pas exister chez le lapin, encore que Chow (cité par Wong) en prenant pour test, il est vrai, la fixation du complément, ait obtenu une réponse positive de la part de cet animal. En ce qui concerne les autres polyosides bactériens, Wong [14], Kurotchkin et Wong [10] ont trouvé que le polyoside préparé par hydrolyse acide du bacille du rhinosclérome sensibilisait le cobaye et provoquait chez le lapin la formation d'anticorps fixant le complément.

Enfin, Boivin et Delaunay [1], tout en considérant le polyoside obtenu par hydrolyse de l'antigène glucido-lipidique du bacille d'Aertricke comme entièrement dépourvu de pouvoir antigénique chez le lapin, observent que le même polyoside, injecté à des souris, augmente sensiblement leur résistance à l'infection par les mêmes bactéries.

EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES.

Ante voulu, au cours d'une expérience antérieure, préparer un lapin témoin destiné à montrer l'absence de pouvoir antigénique, à l'égard de cette espèce, du polyoside typhique dont nous nous servions, nous lui avons injecté de semaine en semaine, par voie intraveineuse : 0,125, 0,25 et 0,5 mg. d'une préparation de polyoside préparé comme ci-dessous, qui, en solution à 1 mg. par centimètre cube était parfaitement limpide et ne donnait pas de précipité visible avec un sérum anti-O (voir sa préparation plus loin) épuisé par le polyoside, nous avons eu la surprise de voir le titre agglutinant du sérum de ce lapin passer d'environ 50 avant toute injection à environ 2.600, huit jours après la troisième injection.

Cette réponse nous paraissant en contradiction avec les opinions généralement admises, nous nous sommes demandé si elle ne pouvait pas s'expliquer par la persistance, au sein de notre solution de haptène, d'une quantité d'antigène complet à la fois trop faible pour être décelée par précipitation, et assez forte pour provoquer l'apparition des anticorps agglutinants.

Pour cela nous avons voulu chercher :

1^o Jusqu'à quel ordre de grandeur on pouvait descendre dans les doses injectées d'antigène complet tout en obtenant une réponse positive.

2^o Si une préparation de polyoside, certainement débarrassée de toute trace d'antigène complet, était bien dépourvue de tout pouvoir antigénique à l'égard du lapin.

Techniques.

L'antigène O est préparé par extraction trichloracétique [2] de bacilles typhiques (souche O-901) cultivés sur gélose, dialyse de l'extrait en sacs de cellophane contre de l'eau de source ou de l'eau bidistillée jusqu'à neutralité, précipitation répétée (deux fois) par 2 volumes d'alcool à 96° et dessiccation.

Pour obtenir le polyoside, une solution d'antigène O est additionnée de 5 p. 100 de son volume d'acide acétique normal et chauffée au bain-marie bouillant (un temps variable selon sa concentration) jusqu'à apparition de flocons ; on centrifuge, on neutralise le surnageant, on le précipite deux fois par 5 volumes d'alcool à 96°, on dessèche le précipité.

Les techniques d'ultrafiltration, dont il sera question plus loin, et la préparation des membranes ont été décrites par l'un de nous [5].

a) *Injection d'antigène complet à faibles doses.* — Pour répondre à la première question, nous avons traité trois séries de lapins de la manière suivante :

a) A 4 lapins nous avons injecté de semaine en semaine par voie intraveineuse 1,25, 2,5 et 5 γ d'antigène O ; leurs sérums, prélevés dix jours après la dernière injection, agglutinaient à des titres variant de 500 à 2.000 au lieu de 20 à 100 avant toute injection.

b) A 4 autres lapins nous avons injecté successivement 0,125, 0,25 et 0,5 γ. Leurs titres agglutinants, de 20 à 266 avant la première injection, étaient de 533 à 1.333 après la troisième injection.

c) Enfin à une dernière série de 3 lapins nous avons injecté chaque jour, pendant dix jours consécutifs, 0,01 γ, soit au total 0,1 γ d'antigène complet par animal.

Les titres agglutinants sont passés de : env. 20 à env. 200, env. 50 à env. 200 chez deux d'entre eux, le titre du troisième n'ayant pas augmenté d'une manière nette.

Il a donc suffi d'une dose extrêmement faible d'antigène O (0,1 γ au total) pour faire apparaître des anticorps décelables par agglutination chez 2 lapins sur 3.

Pour éviter cette cause d'erreur, nous avons cherché à éliminer du polyoside toute trace d'antigène complet en nous servant de l'ultrafiltration.

b) *Séparation du haptène et de l'antigène complet par ultrafiltration.* — Des essais préliminaires nous ont montré que l'antigène O complet était retenu par une membrane de 2 R (diamètre moyen des pores) = 292 mμ, puisque le filtrat d'une solution à 2 mg. par centimètre cube ne précipitait pas avec du sérum anti-O épuisé par le polyoside ; il en était de même, à plus forte raison, du filtrat de la même solution à travers une membrane de 2 R = 224 mμ. Au contraire, la fraction soluble d'hydrolyse traverse les membranes très poreuses, y compris les membranes dont la porosité est de 2 R = 5 mμ, qui retiennent l'ovalbumine.

Nous avons injecté à trois lapins du polyoside ultrafiltré à travers

la membrane de $2\text{ R} = 224\text{ m}\mu$, dont il vient d'être parlé, à raison de $0,25$, $0,5$ et $0,5\text{ cm}^3$ successivement de semaine en semaine par voie intraveineuse d'une solution à 1 mg. environ par centimètre cube.

Le titre agglutinant de ces animaux s'est montré le même dix jours après la dernière injection qu'avant la première.

Deux autres lapins, qui ont reçu dans des conditions analogues du polyoside ultrafiltré à travers une membrane de $2\text{ R} = 5\text{ m}\mu$ se sont, comme il était prévisible, comportés de la même manière.

Il semble donc bien que la réponse positive que nous avions obtenue chez un lapin à la suite d'injection de polyoside non ultrafiltré soit due, comme nous l'avions supposé, à la présence de traces d'antigène complet.

Ceci laisse planer un doute sur l'origine des anticorps qui ont pu être décelés par des méthodes très sensibles comme la fixation du complément chez le lapin et même comme la sensibilisation du cobaye après injection à ces animaux de doses importantes de polyoside.

Les anticorps antipolyoside ne peuvent donc être obtenus chez le lapin, dans les conditions où nous avons opéré, par injection de polyoside pur à l'état dissous.

PRÉPARATION D'UN SÉRUM ANTIPOLYOSIDE.

Pour provoquer chez le lapin la formation d'anticorps exclusivement spécifiques de la fraction soluble d'hydrolyse, il semble donc qu'il faille rendre le polyoside antigénique en le fixant par adsorption sur des particules colloïdales comme l'a fait Zozaya [15] pour divers polyosides ou en le couplant par diazotation avec une grosse molécule, comme l'ont fait Goebel et Avery [4] pour le polyoside pneumococcique (type III).

Nous avons essayé le deuxième de ces procédés, qui semble moins brutal pour l'animal.

Techniques.

a) *Préparation de l'antigène.* — Dans les opérations de diazotation, nous avons suivi la même méthode de Goebel et Avery à cette différence près qu'à défaut de bromure de paranitrobenzoyle, introuvable à la date de ce travail (avril 1943), nous avons dû nous servir de chlorure (en présence de INa) qui donne un rendement très inférieur.

Partant d'une quantité relativement peu élevée de polyoside, ultrafiltré comme il a été dit plus haut (100 mg.), nous avons couplé par diazotation ce polyoside avec des globulines de chien. La quantité faible de produit ne nous a pas permis, de crainte de perte, de fractionner le produit final ni de le doser.

b) *Immunisation.* — Trois lapins ont reçu à faible dose le produit final de la préparation à raison de deux injections intraveineuses par

semaine en doublant la dose chaque semaine pendant trois semaines. Une première saignée a été pratiquée une semaine après la dernière injection ; l'immunisation a été reprise sur le même rythme et aux mêmes doses en faisant alternativement chaque semaine une injection sous-cutanée et une injection intraveineuse pendant trois semaines ; une deuxième saignée a été pratiquée six jours après la dernière injection ; on a continué l'immunisation d'un seul des trois lapins (faute de produit) pendant trois semaines sur le même rythme en partant d'une dose égale à la moitié de celle de la précédente injection ; l'animal a été saigné une semaine après la dernière injection.

Le sérum anti-O qui a servi, comparativement au sérum ci-dessus, aux essais d'inhibition, est un mélange de sérum de lapins immunisés par des injections d'antigène O à doses importantes répétées pendant plusieurs semaines.

c) *Technique d'inhibition de la précipitation spécifique.* — Après avoir mélangé nos séums, purs ou dilués dans du sérum de lapin neuf, avec un volume égal d'eau salée à 0,85 p. 100 ou de solution à diverses concentrations de polyoside ultrafiltré, on centrifuge le lendemain ; on superpose au surnageant une couche de solution d'antigène O à 0,1 mg. par centimètre cube et l'on observe au bout de sept heures environ et de vingt-quatre heures s'il s'est formé un précipité à l'interface.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.

Le titre agglutinant des séums des lapins ainsi traités a légèrement augmenté au cours de l'immunisation, de moins de 20 à : 200 — 400 pour le troisième lapin. Tous nos séums précipitent nettement avec l'antigène O, trop faiblement toutefois pour être titrés avec précision ; mais, fait un peu paradoxal, tous ne précipitent pas ; seuls, ceux du troisième lapin précipitent avec le polyoside ; ceci pourrait s'expliquer par le fait que les complexes formés en petite quantité sont plus près de l'insolubilité lorsque les mêmes anticorps se combinent à l'antigène O très peu soluble que lorsqu'ils se combinent au polyoside très soluble (surtout s'il s'agit d'anticorps à faible valence).

Nous avons cependant, pour éclaircir cette question, fait quelques essais d'inhibition par le polyoside de la précipitation avec l'antigène complet, essais portant sur les deux dernières saignées du lapin qui semblent avoir le mieux répondu à l'immunisation par notre antigène semi-artificiel et sur un sérum anti-O ; ce sérum anti-O est assez riche en anticorps précipitants puisque 1 cm³ donne, à l'équivalence, de 0,200 à 0,216 mg. d'azote précipité par un poids de 0,6 à 0,8 mg. d'antigène complet, ou un poids de 0,089 à 0,095 mg. d'azote précipité par un poids de 0,030 à 0,035 mg. de polyoside.

L'inhibition observée (voir tableau I), n'est pas due à des traces d'antigène O ; en effet, la solution la plus concentrée de polyoside (20 mg. par centimètre cube) ne donne avec un sérum anti-O riche, épousé par le polyoside de manière à ne plus précipiter avec

TABLEAU I (1).

	SÉRUM ANTI-POLYOSIDE				SÉRUM ANTI-O			
	2 ^e saignée Dilutions		3 ^e saignée Dilutions		Dilutions			
	1/1 (2)	1/3	1/10	1/1	1/3	1/10	1/1	1/3
Eau salée à 0,85 p. 100 . . .	+	+	0	+	+	+	+	+
Polyoside à 0,5 p. 100 . . .	+	0	—	+	0	+	0	+
Polyoside à 1 p. 100 . . .	0	0	—	+	0	+	0	+
Polyoside à 2 p. 100 . . .	0	—	—	0	—	—	—	—

(1) Réaction des sérums à l'interface avec une solution d'antigène O à 0,1 mg. par centimètre cube après mélange à parties égales avec des solutions de polyoside à diverses concentrations ou avec de l'eau salée à 0,85 p. 100.

(2) La dilution indiquée est la dilution des sérums dans du sérum neuf; après mélange à parties égales avec une des solutions ci-dessus la dilution finale du sérum lors de la réaction avec l'antigène complet est évidemment double de celle indiquée sur le tableau (1/2, 1/6, 1/20, au lieu de 1/1, 1/3, 1/10,).

lui, qu'un disque très légèrement opalescent à l'interface, réaction non spécifique, car elle se produit, et parfois d'une manière plus nette, avec des sérums de lapins neufs; d'autre part, ces phénomènes d'inhibition sont bien spécifiques, malgré la forte concentration de la solution de polyoside, car un sérum anti-ovalbumine précipite d'une manière identique avec son antigène après qu'on l'a mélangé à parties égales, soit avec cette solution, soit avec de l'eau salée à 0,85 p. 100. Les résultats de ces essais d'inhibition figurent au tableau I, dans lequel il n'a été tenu compte que de l'inhibition absolument complète (1); on voit qu'avec notre sérum anti-polyoside le moins pauvre, 10 mg. de polyoside pour 1 cm³ de sérum ne provoquent pas une inhibition complète; on voit aussi que, dilué au dixième, un sérum anti-O fort est inhibé complètement par un volume égal de polyoside à 20 mg. par centimètre cube, ce qui donna à penser qu'une concen-

(1) Il ne nous a pas été possible de donner à cette expérience d'inhibition une forme quantitative, pour deux raisons: les sérums anti-polyoside sont trop pauvres en anticorps, et la quantité de polyoside nécessaire aurait été considérable; dans ces conditions et sachant qu'une dose faible de polyoside élimine environ la moitié des anticorps précipitables de notre sérum anti-O, il nous aurait paru abusif d'apprécier à l'œil le degré d'inhibition et de l'exprimer par un nombre plus ou moins grand de signes +; c'est pourquoi dans le tableau I le signe O signifie que l'inhibition est absolument complète, mais le signe + ou ± peut correspondre parfois à une inhibition presque complète.

tration assez forte de polyoside pourrait inhiber spécifiquement la précipitation du même sérum pur.

Le polyoside, qui se comporte comme un haptène précipitant à l'égard d'une partie des anticorps O, se comporte en quelque sorte comme un haptène simple à l'égard des anticorps restants ; ceci implique que tous les groupements spécifiques de l'antigène complet sont qualitativement représentés sur le haptène glucidique, mais que les conditions nécessaires pour assurer l'insolubilité des complexes formés ne sont remplies sur le haptène que pour une partie de ces groupements ; à moins, ce qui paraît peu vraisemblable, que les anticorps spécifiques de certains groupements, présents, tous et à l'exclusion des autres groupements, sur certaines molécules de haptène, aient une solubilité beaucoup plus grande que celle des anticorps précipitables par le haptène.

Ces expériences nous conduisent à une conclusion d'intérêt pratique en ce qui concerne l'avenir de la vaccination antityphoïdique : il paraît souhaitable que la vaccination par injection de corps microbiens totaux soit abandonnée dans l'avenir pour être remplacée, à l'image de la vaccination antipneumococcique, par l'injection des seules substances nécessaires au développement de l'immunité ; la toxicité de l'antigène complet, considérable pour certaines espèces animales (2), interdit de l'employer à cet effet. Au contraire, le polyoside n'a jamais, à notre connaissance, manifesté de toxicité.

Soit que le haptène O injecté à l'homme se montre antigénique comme les polyosides pneumococciques, soit, dans le cas contraire qu'on le rende antigénique en le combinant à une molécule peu ou pas antigénique elle-même pour l'homme (un protéide du sérum humain, par exemple), il n'est pas sans intérêt de prévoir malgré ce qu'aurait pu faire penser la précipitation spécifique, que l'immunité ainsi conférée aura, qualitativement, une spécificité aussi complète que celle qui aurait été produite par l'injection de l'antigène complet.

Il est d'ailleurs assez vraisemblable qu'une telle vaccination, purement anti-O, ne suffirait pas à assurer l'immunité anti-infectieuse à l'égard de toutes les souches pathogènes de bacille typhique ; il resterait donc, une fois ce premier problème résolu, à en résoudre d'autres de nature analogue, notamment au sujet de l'antigène Vi et de la toxine neurotropique (Vincent [43], Raynaud [42]).

(2) Au cours d'essais d'immunisation, nous avons vu l'injection intraveineuse de 0,01 mg. d'antigène O entraîner en moins de dix-huit heures la mort d'un chien de 10 kg. environ, alors que cette dose est presque toujours bien supportée par des lapins, même neufs.

RÉSUMÉ

1. — Le polyoside obtenu par hydrolyse acétique de l'antigène somatique O n'a manifesté aucun pouvoir antigénique chez le lapin, à condition que l'on ait préalablement éliminé par ultrafiltration toute trace d'antigène complet.

2. — L'injection d'antigène complet peut provoquer chez le lapin, même à des doses infimes, l'apparition d'anticorps décelables au moyen de l'agglutination spécifique et ceci peut expliquer un apparent pouvoir antigénique de l'hydrolysat, observé par certains auteurs.

3. — Le haptène ultrafiltré, combiné par diazotation à un préteide, fait apparaître, après injection au lapin, des anticorps precipitants.

4. — La précipitation des sérums anti-haptène ainsi obtenus, avec l'antigène complet, n'est inhibée que par des doses considérables de haptène ultrafiltré.

5. — La précipitation d'un sérum O avec l'antigène O est inhibée, elle aussi par de très fortes concentrations de haptène.

6. — Il en résulte que, qualitativement, tous les groupements spécifiques de l'antigène complet se retrouvent sur le haptène.

7. — Ces résultats sont discutés ; on note l'intérêt que peut avoir cette conclusion pour l'emploi éventuel du haptène polyosidique O, en vue de la vaccination antityphoïdique, à condition qu'il soit ou qu'il soit rendu antigénique pour l'homme.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BOIVIN (A.) et DELAUNAY (A.). *Ces Annales*, 1946, **72**, 139.
- [2] BOIVIN (A.), MESROBEANU (I.) et MESROBEANU (L.). *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 1414.
- [3] ENDERS (J. F.) et WU (C. J.). *J. biol. Chem.*, 1934, **60**, 127.
- [4] GOEBEL (W. F.) et AVERY (O. T.). *J. exp. Med.*, 1931, **54**, 431.
- [5] GRABAR (P.). — *L'ultrafiltration fractionnée*. Hermann et C^{ie}, Paris, 1943.
- [6] GRABAR (P.) et HORNUS (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **131**, 244.
- [7] HEIDELBERGER (M.). *Congrès des Sciences pastoriennes*. Paris 1946 (en impression).
- [8] HORNUS (G.) et GRABAR (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **133**, 58.
- [9] HORNUS (G.) et GRABAR (P.). *Ces Annales*, 1941, **66**, 136.
- [10] KUROCHKIN (T. J.) et WONG (S. C.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1938, **38**, 113.
- [11] PAPPENHEIMER (A. M.) et ENDERS (J. F.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1933, **31**, 37.
- [12] RAYNAUD (M.). *Ces Annales* (en impression).
- [13] VINCENT (H.). *C. R. Acad. Sci.*, 1942, **114**, 525.
- [14] WONG (S. C.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1938, **38**, 107.
- [15] ZOZAYA (J.). *J. exp. Med.*, 1932, **55**, 325.

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES INFECTIONS A *Salmonella*

IV. — TECHNIQUE DE PRÉPARATION DES SUSPENSIONS DE BACILLES D'EBERTH POUR LA RECHERCHE DES AGGLUTININES Vi

par Mme J. GRABAR (*).

(*Institut Pasteur. Service des Vaccins.*)

Le bacille d'Eberth, riche de plusieurs antigènes, provoque dans l'organisme l'apparition de plusieurs agglutinines qui correspondent spécifiquement à chaque facteur antigénique. La mise en évidence de ces différentes agglutinines est possible par l'emploi de suspensions spécifiques pour chacune d'elles.

Dans un précédent mémoire [13], nous avons étudié les agglutinines H et O dans le sérum des malades et des vaccinés. Nous n'avons pas parlé de la recherche des agglutinines Vi dans les sérum, car ces agglutinines apparaissent tardivement au cours de la fièvre typhoïde, ordinairement à partir de la troisième semaine, et de ce fait, n'ont pas la valeur diagnostique des agglutinines O et H. Par contre, leur recherche aurait une importance capitale dans le dépistage des porteurs de germes [1, 3, 6, 5, 11, 10] et dans l'appréciation de la valeur d'une vaccination anti-typhoïdique [8, 9, 15, 4]. Le sérum d'un porteur de germes contiendrait des agglutinines Vi ; un bon vaccin anti-typhoïdique engendrerait des agglutinines Vi.

Dans le présent travail, nous décrivons la préparation d'une suspension spécifique pour la recherche des agglutinines Vi dans le sérum. Le choix de la souche est primordial, ainsi qu'il l'est généralement pour la préparation de toute suspension spécifique.

Le meilleur antigène serait celui fourni par une souche Vi pure. Malheureusement, ces souches sont très rares. Félix [7] dans son article sur le titrage du sérum thérapeutique anti-typhoïdique, donne une étude approfondie de l'agglutination Vi. Il décrit quatre souches qui lui ont servi pour la préparation des suspensions. Ce sont les souches Ty 6 S, Vi₁ de Bhatnagar [2], Watson et Ty 2. La première de ces souches est en forme R, et pour cette

(*) Société française de Microbiologie, séance du 9 janvier 1947.

raison, ne peut pas servir d'antigène Vi pour les agglutinations courantes.

Les échantillons que nous avons reçus de Londres, de la souche Vi_1 de Bhatnagar sont aussi tous en forme R. Restent les deux souches Watson et Ty 2. La souche Watson [14, 7] est décrite comme une souche O inagglutinable et très riche en antigène Vi. Félix l'a utilisée pendant des années, pour la détection des agglutinines Vi. Nous l'avons essayée à plusieurs reprises et nous n'avons jamais pu la conserver O inagglutinable. Les échantillons reçus de Londres sont devenus régulièrement agglutinables après deux repiquages et le demeurent, malgré de nombreux passages répétés par la souris. D'après nos expériences, c'est une souche peu stable, aussi bien dans sa composition antigénique que dans son pouvoir pathogène pour la souris. Seule, la souche Ty 2 conserve d'une façon constante ces deux qualités. Elle est O inagglutinable, mais contient beaucoup d'antigène H. C'est avec cette souche que nous avons commencé nos expériences et les résultats obtenus grâce à elle, nous ont permis d'étendre le principe de la préparation de la suspension Vi à d'autres souches.

Les années de guerre nous ont encore plus clairement montré les difficultés d'obtention des souches microbiennes, et dans ce travail, nous montrons, incidemment, qu'une technique est d'autant meilleure qu'elle est plus générale. Nous décrivons, en effet, un protocole qui permet l'emploi de toute souche d'Eberth lisse riche en antigène Vi, O inagglutinable et stable.

Une souche O inagglutinable n'est pas dépourvue pour ce qu'il y a d'antigène O. C'est uniquement l'agglutinabilité O qui se trouve masquée. Dans une suspension alcoolique où l'antigène II est détruit, les antigènes O et Vi, somatiques tous les deux, et donnant également une agglutination type granulaire (plus fine cependant pour le Vi), sont conservés. La coexistence possible des antigènes O et Vi ne gêne en rien la lecture d'une agglutination type O, l'aide d'une suspension alcoolique, car la teneur en agglutinines Vi d'un sérum, est très faible par rapport à sa richesse en agglutinines O. Par contre, l'emploi d'une telle suspension alcoolique n'est plus possible pour la préparation de l'antigène Vi, car, nous l'avons dit plus haut, les deux antigènes O et Vi peuvent exister dans la même souche.

Nous avons pensé qu'il fallait, pour obtenir une suspension Vi pure, éliminer l'antigène H, et entraver au maximum l'agglutinabilité O de la souche et décrivons ci-dessous le protocole suivi dans ce but.

PRÉPARATION DE LA SUSPENSION Vi.

Le développement de certains antigènes est empêché par l'ensemencement d'une souche de *Salmonella* sur milieu gélosé additif.

tionné d'immunsérum spécifique [12]. Nous avons appliqué ce principe en ensemencant la souche Ty 2, O inagglutinable, sur milieu gélosé contenant un sérum anti-typhoïdique de titre H 1/6.400 et de titre O 1/200. La préparation de ce milieu est simple. 15 cm³ de gélose ordinaire sont fondus et additionnés de 0,1 cm³ de sérum anti-H. Le tout est soigneusement mélangé et coulé en boîtes de Petri.

Le milieu est alors ensemencé avec la souche Ty 2, mis à l'étuve à 37° pendant vingt-quatre heures et on procède à l'examen de la culture. Les colonies sont lisses, brillantes, les germes n'agglutinent pas spontanément dans des solutions de ClNa à 0,8 p. 100 et à 2,5 p. 100. De mobiles, les germes sont devenus immobiles et ne sont plus agglutinés que par le sérum anti-Vi pur ; cette recherche se fait sur lame.

La culture, ainsi examinée, est raclée et mise en suspension dans une petite quantité d'eau physiologique formolée à 0,2 p. 100; la densité microbienne est alors très élevée. Des suspensions à 400 millions de germes par millimètre cube sont obtenues par simple dilution de cette suspension mère. Ces suspensions, de teneur microbienne différente, sont demeurées stables et sensibles pendant trois mois au minimum.

Nous avons suivi le même protocole avec d'autres souches de bacilles d'Eberth, O inagglutinables, prises dans notre collection de souches. Sur 6 souches examinées, 3 sont devenues R après culture sur gélose-immunsérum, dont la souche Watson.

SENSIBILITÉ DES SUSPENSIONS VI.

Elles furent éprouvées vis-à-vis d'un sérum Vi dont le titre nous était connu. Leur valeur fut établie par rapport au taux d'agglutinabilité de la souche Ty 2 par ce sérum. Nous considérons comme utilisables les suspensions possédant le même titre que la suspension Ty 2 ; 2 des 3 souches donnèrent ce résultat, la troisième a eu un taux inférieur.

CONTRÔLE DE LA SPÉCIFICITÉ DES SUSPENSIONS.

Les suspensions des souches Ty 2 et E. 100 furent titrées vis-à-vis des sérum anti-O, anti-H, anti-Vi. Les résultats sont donnés dans le tableau I.

D'autre part, nous avons préparé, à partir de ces souches, des émulsions alcooliques (O) et formolées (H) et avons recherché leur taux d'agglutinabilité vis-à-vis d'un sérum anti-typhoïdique polyvalent (de titre H = 1/25.000, O = 1/6.400 et Vi = 1/400 — 1/800). Les résultats sont exposés dans le tableau II.

On peut en conclure que nos suspensions Vi sont spécifiques.

TABLEAU I.

	SÉRUMS UTILISÉS DILUÉS A						TÉMOINS Suspensions
	1/50 vis à vis d'une suspension de la souche Ty 2 (ou E. 100)	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1.600	
Anti-O 901 . . .	—	—	—	—	—	—	—
Anti-H 901 . . .	—	X	—	—	X	—	—
Anti-Vi Watson . . .	X	—	X	—	X	X	—

Etude deux heures et vingt heures à la température du laboratoire :

Centrifugation :							
Anti-O 901 . . .	—	—	—	—	—	—	—
Anti-H 901 . . .	—	—	—	—	—	—	—
Anti-Vi Watson . . .	X	—	X	—	X	X	—

—, pas d'agglutination; X, agglutination Vi.

TABLEAU II.

SUSPENSIONS	SÉRUM ANTITYPHOIDIQUE DILUÉ A								TÉMOINS Suspensions
	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1.600	1/3.200	1/6.400	1/12.800	
Ty 2H (ou E. 100 H) . . .	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ty 2O (ou E. 100 O) . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ty 2Vi (ou E. 100 Vi) . . .	X	X	X	X	—	—	—	—	—

++, agglutination type H; +, agglutination type O; X, agglutination type Vi; —, pas d'agglutination.

TECHNIQUE D'AGGLUTINATION.

Nous avons appliqué comparativement les techniques à l'étuve à 37° et la centrifugation. Les résultats sont donnés dans le tableau III. Ils sont sensiblement égaux et nous avons adopté pour la recherche des agglutinations Vi la technique par centrifugation.

APPLICATION DE LA SUSPENSION Vi AU SÉRO-DIAGNOSTIC.

Dans les tableaux IV, V et VI, nous donnons quelques résultats de l'utilisation de cette suspension en clinique. C'est le tableau V

TABLEAU III.

Titrage des agglutinines O, H et Vi d'un immunsérum vis-à-vis de différentes suspensions.

Lire : première ligne, après un séjour de deux heures à l'étuve à 37° et vingt à la température du laboratoire; deuxième ligne, après centrifugation.

TABLEAU IV. — Cas C. M... Fièvre typhoïde cliniquement très grave. Hémoculture positive au bacille d'Eberth. Premier séro-diagnostic prélevement fait la troisième semaine de la maladie.

TABLEAU V. — Cas E. C... Fièvre typhoïde cliniquement très grave : Hémoculture positive au bacille d'Eberth. Premier séro-diagnostic : prélèvement fait le dixième jour de la maladie.

SUSPENSIONS	SÉRUM DILUÉ A							
	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/200	1/400
EO	+	+	+	+	+	+	±	±
EH	—	—	—	—	—	—	—	—
EVi	—	—	—	—	—	—	—	—

Premier prélèvement fait le 12 novembre 1946 :

EO	+	+	+	+	+	+	+	+
EH	—	—	—	—	—	—	—	—
EVi	X	—	—	—	—	—	—	—

Deuxième prélèvement fait le 16 novembre 1946 :

EO	+	+	+	+	+	+	+	+
EH	—	—	—	—	—	—	—	—
EVi	X	—	—	—	—	—	—	—

Troisième prélèvement fait le 6 décembre 1946 :

EO	+	+	+	+	+	+	+	—
EH	++	++	++	++	++	++	++	—
EVi	X	X	X	X	X	X	X	—

TABLEAU VI.

SUSPENSIONS	SÉRUM DE MALADE DILUÉ A									
	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1.600
EO	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
EH	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EVi	X	X	X	X	X	—	—	—	—	—

Cas B... Hémoculture positive au bacille d'Eberth :

EO	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
EH	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
EVi	X	X	X	X	X	—	—	—	—	—

Cas L... Hémoculture positive au bacille d'Eberth :

EO	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
EH	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EVi	X	X	X	X	X	—	—	—	—	—

Cas M... Hémoculture positive au bacille d'Eberth :

EO	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
EH	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EVi	X	X	X	X	X	—	—	—	—	—

qui semble surtout suggestif, car dans le cas qu'il illustre, nous avons pu observer l'apparition des agglutinines Vi et leur montée au cours de la maladie.

Dans tous ces cas, on peut remarquer le faible taux de l'agglutination Vi comparé à celui de l'agglutination O et H. La saturation d'un sérum de malade par des suspensions O et H, pour éliminer les agglutinines correspondantes, s'avère pratiquement inutilisable pour la recherche ultérieure des agglutinines Vi.

CONCLUSION.

Nous proposons une technique simple de préparation d'une suspension spécifique Vi, à partir d'une souche appropriée de bactérie d'Eberth. Elle consiste à cultiver une souche lisse, O inagglutinable, possédant les antigènes H et Vi, sur un milieu gélosé additionné de sérum anti-H spécifique, puis formolisation de la suspension obtenue. Les suspensions sont stables, inoffensives, sensibles et spécifiques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BHATNAGAR (S. S.). *Brit. med. J.*, 1938, **11**, 1195.
- [2] BHATNAGAR (S. S.) et coll. *J. Hyg.*, 1938, **38**, 663.
- [3] BROWER. *Am. J. Hyg.*, 1944, **40**, 154.
- [4] DURAND (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1945, **89**, 719.
- [5] ELIOT (C. P.). *Am. J. Hyg.*, 1940, **31** B, 8.
- [6] FÉLIX (A.). *Lancet*, 1938, 738.
- [7] FÉLIX (A.). *J. Hyg.*, 1938, **38**, 750.
- [8] FÉLIX (A.). *Brit. med. J.*, 1941, **1**, 391.
- [9] FÉLIX (A.) et coll. *Ibid.*, 435.
- [10] FÉLIX (A.) et coll. *Ibid.*, 1943, 127.
- [11] FÉLIX (A.). *Brit. med. Bull.*, 1944, **2**, 269.
- [12] GARD (S.). *Zeitschr. Hyg.*, 1938, **120**, 139.
- [13] GRABAR (J.) et BONNEFOI (A.). *Ces Annales*, 1946, **72**, 745.
- [14] PERRY (H. M.), FINDLEY (H. T.) et BENSTED (H. J.). *J. Royal Army Med. Corps*, 1933, **61**, 81.
- [15] SILER et coll. Monographie n° 17 du *Am. J. Hyg.*, 1941.

CARACTÈRES DES CULTURES SECONDAIRES OBTENUES PAR L'ACTION DU BACTÉRIOPHAGE SUR LE BACILLE DE LA PESTE

A PROPOS DES MUTATIONS DU BACILLE PESTEUX EN BACILLE PSEUDO-TUBERCULEUX

par G. GIRARD (*).

(*Institut Pasteur. Service de la Peste.*)

Parmi les espèces bactériennes, le bacille de la peste représente peut-être la plus homogène à l'égard du bactériophage. Nous n'avons jamais vu de souche qui fût naturellement résistante à la lyse avec les bactériophages dont nous disposons et qui sont actifs à la dilution de 10^{-8} . La lyse de la culture quand le phage est ajouté après vingt-quatre heures, ou son inhibition quand l'addition est contemporaine de l'ensemencement, sont totales et définitives dans presque tous les cas, et cette propriété est mise à profit pour le diagnostic microbiologique de la peste (M. Advier, G. Girard) et pour le contrôle de la pureté des souches (1). Des échantillons entretenus depuis cinquante ans au laboratoire et privés de tout pouvoir pathogène, aussi bien que des souches fraîchement isolées de l'organisme humain ou animal et très virulentes se comportent de façon identique vis-à-vis des bactériophages spécifiques. Notre expérience porte sur plusieurs centaines de souches, car nous avons toujours soumis à l'action du phage toutes les cultures isolées à Madagascar de 1932 à 1940 et avons opéré de même depuis cinq ans sur les souches d'autres provenances qui font partie de la collection du laboratoire. Tout récemment J. Robic nous rapportait 19 nouvelles cultures de Tananarive chez lesquelles nous faisions des constatations identiques. Exceptionnellement on voit apparaître des cultures secondaires dans des hémocultures ou des subcultures en bouillon si l'on utilise notamment des filtrats bactériophagiques maintenus sans répiquages pendant plusieurs années à la température du laboratoire et dont la virulence a, de ce fait, fortement fléchi.

(*) Société française de Microbiologie, séance du 5 décembre 1946.

(1) G. GIRARD, *Ces Annales*, 1942, **68**, 476.

E. I. Korobkova (2), qui a procédé à l'Institut de Microbiologie de Saratov à une étude des variantes ou des mutants ainsi obtenus, a souligné la grande diversité morphologique de leurs colonies et des éléments qui les constituent, décrivant en particulier des formes géantes à noyau (3). Elle a noté la dissociation en types nettement tranchés R et S, la perte de virulence des mutants, leur résistance plus ou moins accusée à la lyse secondaire par un phage plus actif ainsi que la possession à l'état latent d'une capacité lysogène chez certains éléments devenus phago-résistants. Elle a également constaté des modifications des propriétés biochimiques dont la plus importante, la fermentation du rhamnose avec production d'acide, retient tout spécialement l'attention. On sait, en effet, que ce glucide est toujours attaqué par le bacille de la pseudotuberculose des rongeurs, mais jamais par le bacille de la peste et que la différenciation des deux germes si voisins par tant d'autres caractères est en partie fondée sur cette réaction.

Les recherches auxquelles nous avons procédé à Tananarive et à Paris et qui sont loin d'avoir l'ampleur de celles de Korobkova confirment toutefois ses conclusions pour ce qui est de la physiologie des cultures secondaires. Sur un même tube, on voit les deux variantes R et S, mais cet aspect macroscopique S, qui est au surplus courant avec le bacille pesteux, n'entraîne pas pour les cultures lisses secondaires la totalité des propriétés inhérentes à ce type telles qu'on les connaît dans le groupe des *Salmonella*, par exemple. C'est ainsi qu'on ne met jamais en évidence la présence d'un complexe antigénique glucido-lipidique chez le bacille pesteux (Pirowsky, Girard). Quant aux colonies dénommées spécifiquement R par Korobkova, certaines ont bien un aspect qui ne se rencontre pratiquement jamais dans les cultures « ultrapures » (au sens donné par d'Hérelle à ce terme) de bacilles de Yersin ; elles sont sèches, grisâtres ou translucides, à bords crénelés, très difficiles à conserver, donnant en bouillon des cultures très grêles qui se présentent après agitation comme une suspension de sable très fin et brillant.

Les premières cultures secondaires que nous ayons constatées provenaient d'une souche très virulente de peste pulmonaire dont les ensemencements en bouillon nutritif avaient été additionnés, pour quelques tubes, d'un phage isolé de crottes de rat (*R. rattus*), pour d'autres, d'un phage trouvé dans un broyat de puces (*X. cheopis*) prélevées sur ces mêmes rats dans un foyer d'endémo-épidémie pesteuse à Madagascar. Les tubes restèrent limpides pendant douze jours avec le premier phage, trente-trois

(2) E. I. KOROBKOVA, *Rev. Epid. microb. parasit.* Saratov, 1937, 16, 15.

(3) E. I. KOROBKOVA, *Rev. Epid. microb. parasit.* Saratov, 1937, 16, 4.

jours avec le deuxième, après quoi se développa une culture ayant l'apparence d'une culture de peste. Repiquées sur gélose, les deux variantes décrites par l'auteur russe étaient nettement visibles, mais nous échouâmes à maintenir la vitalité des colonies R. L'examen, après coloration des éléments constitutifs de ces colonies d'origine, montrait une grande variété morphologique : peu d'éléments coccobacillaires, mais des formes en anneau, petites ou volumineuses, des formes en raquette ou en biscuit dont certaines énormes, mal colorées et manifestement en état de pré-lyse. Dans les subcultures, ces formes anormales avaient tendance à disparaître pour faire place aux formes clas-

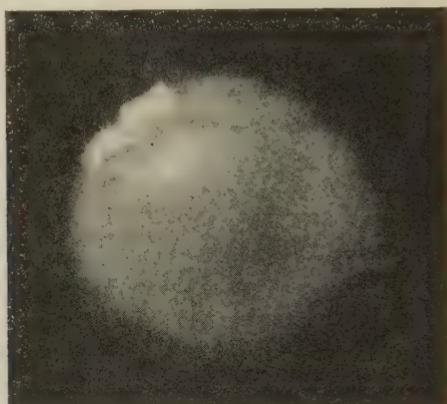


FIG. 1. — Bacilles pestueux. Colonies normales, type S.

siques. En vérité, il ne nous semble pas que le bactériophage ait provoqué des structures microbieniques que nous ne connaissions déjà dans les cultures de bacilles pestueux dont la morphologie subit les variations considérables suivant les conditions dans lesquelles elles se développent (température, composition du milieu, âge de la culture). Les formes dites d'involution peuvent affecter tous les aspects ci-dessus énumérés, même dans des cultures jeunes, mais ce polymorphisme est beaucoup plus accusé dans les cultures secondaires consécutives à l'action du bactériophage.

Dans ces premières expériences, nous avons étudié au point de vue de leurs caractères biochimiques et de leur virulence 3 colonies qui purent être repiquées en série. Elles se comportèrent vis-à-vis des glucides, et notamment de la glycérine et du rhamnose, comme la souche originale. Quant à la virulence, elle avait considérablement baissé mais à des degrés différents.

suivant les échantillons. Ainsi, la variante B7 ne tuait plus ni le cobaye ni la souris à des doses mille fois plus élevées que la souche d'origine, virulente, entretenue dans les mêmes conditions que les cultures secondaires. L'inoculation sur peau rasée et excoriée du cobaye d'une suspension contenant plusieurs milliards de germes par centimètre cube ne déterminait pas la moindre réaction locale. Les cobayes inoculés par voie cutanée,

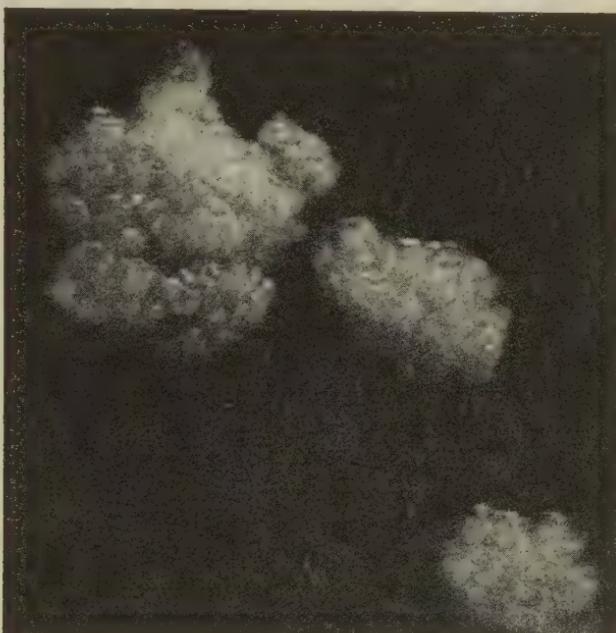


FIG. 2. — Bacilles pestueux.
Colonne type R secondaire à l'action du bactériophage.

éprouvés quinze jours plus tard avec la souche pathogène d'où dérivait cette variante, ne possédaient pas trace d'immunité et succombaient de peste aiguë dans les mêmes délais que les cobayes témoins ; mais les souris résistaient à cette épreuve qui tuait les témoins en quarante-huit heures. Avec la variante B6, virulente également pour le cobaye et la souris, le résultat fut inverse : un cobaye résista à l'épreuve qui tua le témoin en six jours tandis qu'une souris succombait en même temps que le témoin. La culture B2G ne se montrait pas dépourvue de pouvoir pathogène, car elle tuait le cobaye de peste chronique en douze jours par voie sous-cutanée et, sur peau rasée, provoquait une adénite qui se résorbait en quinze jours. L'inoculation sous la

peau de la souris restait sans effet, mais, par voie péritonéale, l'animal mourait de peste aiguë en trois jours.

Des constatations du même ordre furent faites en 1942 à Paris sur une variante dérivée d'une souche virulente additionnée de bactériophage pesteux (isolé par Advier à Dakar, en 1931, et gardé depuis en ampoules à la température du laboratoire) : résistance du cobaye à l'inoculation de fortes doses et immunité consécutive ; virulence affaiblie, mais encore marquée pour la souris qui meurt avec des lésions de peste chronique en six et huit jours après l'inoculation de 500 millions et 1 milliard de germes tandis que la souche d'origine la tue de peste aiguë à des doses mille fois moindres en deux et trois jours. Comme précédemment, cette variante n'a pas subi de modification dans ses propriétés fermentatives à l'égard des glucides.

Par un processus analogue, nous avons obtenu des cultures secondaires avec la souche E. V. (Girard et Robic) employée comme vaccin vivant dans l'immunisation de l'homme et la préparation des chevaux producteurs de sérum. La plupart, véritables mutants, n'étaient repiquables qu'en présence de sérum antiphage. L'une d'elles, étudiée avec le concours de R. Neel, était constituée en partie de colonies du type S (souche E. V. 2S) dont des subcultures furent aisément entretenues sans sérum antiphage ; elles avaient la propriété de s'émulsionner avec la plus grande facilité dans l'eau salée physiologique en donnant des suspensions stables. Leur valeur antigène, leur toxicité étaient inférieures à celles de la souche E. V. d'origine, mais les propriétés biochimiques étaient identiques.

Ajoutons que toutes les variantes dont nous avons brièvement défini les principaux caractères étaient lysées par un bactériophage plus virulent que celui qui leur avait donné naissance.

A l'occasion d'un cas mortel de peste bubonique traité par le bactériophage et que nous avons suivi avec M. Milliau (4), nous avons fait une constatation qui mérite d'être soulignée, car c'est la seule fois, à notre connaissance, que l'occasion ait été donnée d'isoler d'une part, au début de la maladie, d'autre part après la mort, deux cultures de bacilles pesteux dont la seconde avait les caractères d'un véritable mutant. L'intérêt de cette observation ne nous est apparu que plus tard. Contrastant avec la haute virulence habituelle du germe isolé du bubon avant le traitement, les lésions de peste chronique provoquées par l'inoculation au cobaye du matériel prélevé dans les bubons et le foie après la mort, l'impossibilité de maintenir la vitalité du germe isolé par culture de ces lésions nous font aujourd'hui présumer que cette anomalie était imputable à une contamination du bacille pesteux par le

(4) G. GIRARD et M. MILLIAU, *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1935, 28, 880-883.

bactériophage. Au cours de notre longue pratique de la peste humaine, jamais nous n'avions fait pareille remarque et toujours nos cobayes inoculés avec du matériel pesteux succombèrent avec des lésions de peste aiguë ou suraiguë et la culture de l'agent spécifique fut aisément obtenue et repiquée ultérieurement, même quand ce matériel provenait de pesteux ayant reçu du bactériophage à titre thérapeutique.

DISCUSSION.

Des faits expérimentaux que nous rapportons, il résulte que les bacilles pesteux qui se développent secondairement au sein d'une culture virulente additionnée d'un bactériophage de faible activité tendent à perdre tout ou partie de leur virulence. Cette remarque ne vaut naturellement que pour les colonies qui sont repiquables en série et qui affectent le type S. Nous confirmons sur ce point les conclusions de Korobkova. La seule observation que nous possédons de mutant obtenu *in vivo* sous l'action d'un phage spécifique vient encore à l'appui de cette thèse. Soit dit en passant, nous ne pouvons souscrire à l'opinion de d'Hérelle qui, envisageant l'éventualité de l'apparition de mutants chez les pesteux traités par un bactériophage qui n'aurait agi que partiellement, écrit que « *les mutants du bacille pesteux sont très virulents* » (5). Affirmation gratuite, qui n'est étayée sur aucune recherche expérimentale. Qu'un pesteux, qui a reçu du bactériophage, succombe avec un germe de haute virulence égale à celle du germe d'un malade non traité, le fait n'implique pas que le premier soit un mutant, mais tout simplement un bacille pesteux normal qui n'a pas subi l'action du principe lytique. Toutes les fois que nous avons, dans de telles conditions, étudié les souches isolées chez les malades ou les cadavres, nous les avons trouvées, exception faite de l'unique cas relaté plus haut et qui infirme la thèse de d'Hérelle, très sensibles à la lyse par le phage même qui avait été administré en cours de maladie ; elles cultivaient normalement et ne se différenciaient en aucune façon des souches classiques.

Quant aux modifications des propriétés biochimiques des cultures secondaires signalées par Korobkova, mais que pour notre part nous n'avons jamais observées, le fait est d'importance par suite des déductions que notre collègue de Saratov en tire et dont la portée ne saurait être sous-estimée. En effet, sous l'action du bactériophage, les divers mutants R ou S devenus avirulents et ayant acquis la propriété de faire fermenter le

(5) D'HERELLE, *Le phénomène de guérison dans les maladies infectieuses* (Masson, 1938), 248.

rhamnose auraient ainsi perdu les principaux caractères qui les distinguaient du bacille pseudotuberculeux. Par voie de conséquence, *Pasteurella pseudotuberculosis* pourrait n'être que *P. pestis* muté sous l'influence du principe lytique. Déjà, en 1928, Zlatogoroff et Moghilewskaia tendaient à considérer le bacille de Malassez et Vignal comme une variante R du bacille de Yersin et W. F. Harvey, en 1933 (6), comme un bacille pestieux en symbiose avec le bactériophage.

Cette conception, en vérité séduisante et que les auteurs russes déduisent logiquement de leurs travaux tendrait à unir encore plus étroitement les deux microorganismes déjà si rapprochés par nombre de propriétés communes. Elle suscite toutefois des sérieuses réserves, car l'individualité de chacun de ces agents pathogènes reste indiscutable. Faire du bacille de Malassez et Vignal un bacille de Yersin dégradé dans sa virulence ne correspond nullement aux faits d'observation courante. Il n'est pas dans notre dessein de développer ici ce point de vue, qu'il nous suffise de rappeler qu'en pathologie humaine la pseudotuberculose répond à une entité clinique et bactériologique bien déterminée, qu'elle est une affection grave et généralement mortelle (7), alors que les formes ambulatoires de la peste bubonique sont fréquentes dans lesquelles l'agent spécifique n'en garde pas moins tous ses caractères classiques. La peste chronique du cobaye ressemble bien anatomiquement à la pseudotuberculose, mais reste bactériologiquement de la peste.

En dehors de toute intervention apparente d'un bactériophage, Bezsonova et ses collaborateurs (8) avaient rapporté, en 1937, plusieurs cas de transmutation spontanée du bacille de la peste en bacille de la pseudotuberculose (5 souches sur 214 de leur collection). Rapprochant ces constatations de celles de Korobkova tandis que nous n'avons jamais rien vu de semblable et que notamment aucune de nos souches de peste, contrôlées à cet égard de façon régulière, n'acidifia les milieux glycérinés ou rhamnosés, nous pensons devoir attribuer cette antinomie à un caractère particulier aux souches russes lesquelles, à l'origine, ont le pouvoir de faire fermenter la glycérine au même titre que toutes les souches de pseudotuberculose. La gélose glycérinée tournesolée ne peut servir à différencier les deux espèces microbiennes en Russie, mais garde pour nous toute la valeur que J. Colas-Belcour lui avait reconnue dès 1926. Si l'on scrute de plus près le problème, on se rend compte que toutes les souches

(6) W.F. HARVEY, *Trop. Dis. Bull.* 1933, **30**, 338 et 412.

(7) E. DUJARDIN-BEAUMETZ, *Rev. Path. Comp.*, 1938, **38**, 884.

(8) A. BEZSONOVA, G. LENSKAIA, P. MOLODZHOVA et O. MOSSOLOVA, *Bull. Off. Int. Hyg. Publ.*, 1937, **29**, 2106.

de peste, sans exception, dont le rat et ses puces sont le réservoir de virus, répondent au type décrit par Yersin en 1894, et que leur passage par l'homme, le cobaye ou la souris ne modifie en rien leurs caractères. L'acidification des milieux glycérinés appartient par contre aux souches de peste sylvatique telle qu'on la rencontre chez des rongeurs sauvages, spermophiles des steppes russes, ground squirrels de Californie, et aussi parfois gerbillines de l'Afrique du Sud. Possédant déjà un des caractères particuliers au bacille de la pseudotuberculose, elles ont tendance à dévier vers ce type, soit naturellement, soit sous l'action du bactériophage. Il serait très instructif, dans cet ordre d'idée, de comparer la toxicité des cultures originales de ces deux provenances, peste murine et peste sylvatique. Les extraits ou les filtrats de culture de peste sont toxiques pour le rat et la souris, ceux du bacille de Malassez ne le sont pas. Espérons que la reprise normale des relations culturelles dans le monde permettra de combler cette lacune par l'échange du matériel propice à cette étude qui intéresse au plus haut point certains aspects encore obscurs de l'épidémiologie et de la prophylaxie de la peste.

En résumé et pour conclure, nous dirons que sous l'action du bactériophage on peut voir apparaître des cultures secondaires de bacilles pesteux dont les caractéristiques dominantes sont, par rapport aux souches qui leur ont donné naissance, une dégradation dans le sens de la virulence et de la valeur antigène. Les colonies isolées de ces cultures secondaires affectent les formes les plus variées allant du type R au type S, ces dernières étant seules repiquables en série, avec ou sans addition de sérum antiphage. Pour certaines souches de peste sylvatique, des mutations ont été observées, transformant en bacilles de la pseudotuberculose des cultures secondaires identifiées à l'origine comme étant des cultures de peste. Ce phénomène n'a encore jamais été constaté sur des souches de peste murine en provenance de régions où la peste sylvatique est inconnue. Mais il convient de souligner que toutes les modifications imprimées par le bactériophage — variantes R et S, perte de virulence, mutation, — sont susceptibles de se produire naturellement sans que l'on soit fondé à les attribuer à l'action d'un hypothétique principe lytique, car les souches ainsi modifiées restent, comme celles dont elles dérivent, sensibles à la lyse et ne sont pas elles-mêmes lysogènes ; le bactériophage provoque toutefois la précipitation des processus. La seule manifestation véritablement imputable au bactériophage est l'apparition de colonies R dont la plupart ne survivent pas au repiquage et dont l'étude ne peut être entreprise qu'avec le secours d'un sérum antiphage. Cette étude reste à faire.

SUR L'UTILISATION DU GLUCOSE PAR LE VIBRION CHOLÉRIQUE EN AÉROBIOSE FORCÉE (*)

par JEAN GALLUT.

(*Institut Pasteur, Laboratoire des Instituts Pasteur Coloniaux.*)

L'étude du potentiel d'oxydo-réduction du vibion cholérique que nous avons faite récemment [4] nous a permis de montrer (par les deux méthodes colorimétrique et potentiométrique) que ce germe, loin d'être suivant la notion classique un aérobiose strict, se comporte en anaérobiose facultatif. Le pouvoir réducteur qu'il manifeste pendant la phase logarithmique de sa croissance est trop prononcé (E_h voisin de -200 millivolts à pH7 soit $rH = 7$) pour qu'on puisse considérer comme véritablement aérobies ses cultures pratiquées en milieu liquide même sous une faible épaisseur.

Une aérobiose stricte ($E_h \geq 0$ mv.) ne peut être obtenue qu'en aérant artificiellement les milieux par un barbotage d'air continu et suffisamment énergique. Ce mode de culture à aération forcée démontre la facilité d'adaptation du vibron à un potentiel positif bien plus élevé que celui qu'il imprime spontanément aux milieux usuels, car il permet même d'obtenir un rendement accru. Il présente en outre un intérêt particulier dans le cas de milieux additionnés de glucose. Après Hirsch [2] qui avait déjà noté la différence des modes d'utilisation du glucose en aérobiose et en anaérobiose, J. Blass [3], en comparant les consommations de glucose des suspensions *non proliférantes* des vibrions cholériques placés sous azote ou dans un courant d'air, a démontré que seule une aération énergique permet aux vibrions d'utiliser le glucose par voie d'oxydation et non de fermentation. L'utilisation de ce sucre, en aérobiose stricte peut ainsi être beaucoup plus complète, puisqu'il n'y a plus acidification du milieu ; acidification qui, on le sait, produit rapidement la mort du vibron cholérique.

De même Linton et Jennings [4] s'étant attachés à la production massive des vibrions cholériques en milieux liquides se sont

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 9 janvier 1947.

arrêtés à une technique d'aérobiose forcée par barbotage intense d'un mélange d'air et de CO_2 en milieu glucosé bicarbonaté.

La technique de ces derniers auteurs est d'un intérêt certain et nous l'avons vérifié, elle permet d'obtenir en vingt-quatre heures en milieux relativement pauvres en azote, une récolte très abondante de germes, qui se développent ainsi presque uniquement aux dépens du glucose.

Nous avons signalé nous-même [4] qu'en milieu glucosé maintenu à un E_{H}° positif, le rendement des vibrions cholériques est souvent triple de celui obtenu dans le même milieu glucosé évoluant spontanément en réduction et en fermentation.

Par ailleurs, dans les précédents travaux que nous avons faits, en collaboration avec P. Noël-Bernard sur la toxine cholérique [5, 6], nous avions insisté sur le rôle du glucose dans la toxinogénèse. Ce sucre, disions-nous, intervient en produisant la mort des vibrions (et par suite la libération de l'endotoxine), par l'acidité qu'ils ont engendrée. Ce processus paraît bien démontré lorsque la toxine est produite suivant la technique de P. Noël-Bernard et Gallut, dans laquelle les vibrions, obtenus par culture en milieu nutritif azoté, sont mis en contact avec le glucose à l'état « non proliférant » (Blass [7]).

Il ne saurait par contre, être admis d'emblée dans le cas d'une culture normale où le vibrio prolifère en milieu azoté et glucosé. Dans ce cas, il n'est pas possible de savoir si le glucose intervient en outre, dans la toxinogénèse, par sa consommation même, c'est-à-dire comme facteur de nutrition du vibron, et partant d'élaboration de la toxine, et non pas seulement par l'acidité de sa fermentation, c'est-à-dire comme facteur léthal et par suite de libération de la toxine formée aux dépens des substances azotées.

C'est pourquoi le comportement du *V. cholérique* en milieux liquides glucosés strictement aérobies nous est apparu *a priori* comme étant susceptible de nous éclairer sur la toxinogénèse de cette bactérie.

Technique. — Afin d'obtenir des cultures véritablement aérobies il était indispensable de pouvoir vérifier d'une façon permanente les variations du pH et du E_{H}° et de les maintenir dans les limites optima (pH compris entre 7,0 et 8,5 ; E_{H}° compris entre 0 et + 100). Nous avons eu recours pour cela à une technique dérivée de celle de Linton et Jennings [4].

Un ballon à fond rond de 3 l. de capacité contenant le milieu de culture sous un volume de 1 l. est fermé par un bouchon de caoutchouc à 3 trous laissant passage à un premier tube long pour le barbotage forcé, un deuxième tube court pour la sortie des gaz et un troisième tube descendant comme le premier jusqu'au fond du ballon. Ce dernier tube permet l'aspiration à intervalles réguliers d'un échantillon du milieu dans une chambre accessoire spéciale en verre où se font les mesures du pH au moyen d'une électrode de verre et du E au

moyen d'une électrode de platine brillant. La jonction est faite entre la chambre de mesure et un élément au calomel par un pont de gélose, et les mesures électriques effectuées au moyen du potentio-pHmètre de Jouan.

Le barbotage se fait par aspiration au moyen d'une trompe à eau, soit d'air atmosphérique, soit de gaz carbonique, soit d'un mélange dosable à volonté d'air et de CO_2 .

On peut agir à volonté sur l'oxydation du glucose et par suite sur le pH en faisant varier séparément le débit et la proportion de ces deux gaz. Tous nos essais ont été faits à une température de 37° C et pendant un temps d'incubation de vingt-quatre heures.

RÉSULTATS.

Nous nous sommes efforcé d'obtenir, en milieux aérés ne contenant que le seul glucose en présence du minimum d'azote, une production de germes du même ordre de grandeur que celle fournie par les milieux azotés usuels évoluant spontanément en réduction.

Pour cela, nous avons utilisé un milieu contenant uniquement du glucose en solution dans de l'eau distillée additionnée d'un tampon, de préférence le bicarbonate de sodium, pour stabiliser plus aisément le pH [4]. Ce milieu ne contient pas d'azote ; la quantité de N nécessaire et suffisante à une croissance rapide optima est fournie par le seul ensemencement. Celui-ci a été pratiqué avec une culture de *V. cholérique*, âgée de seize à vingt heures, en différents milieux plus ou moins riches en azote. De bons résultats ont été obtenus régulièrement avec de l'eau peptonée ordinaire (peptone Uclaf 30, NaCl 5 p. 1.000) dont 50 cm³ servaient à ensemencer les 1.000 cm³ d'eau glucosée (15 g.) bicarbonatée (12 g.) constituant le milieu de culture.

Dans ces conditions, nous avons pu faire sur ces cultures les observations suivantes :

1^o Variations du pH, du E_H et du rH .

La figure 1 montre les variations concomitantes en vingt-quatre heures de la réaction et du potentiel d'oxydoréduction d'une culture aérée, en comparaison avec les cultures aérobies en eau peptonée, soit normale, soit glucosée (fig. 1). La figure 2 résume les 2 courbes de chaque milieu en une seule, celle du rH obtenue par la formule

$$rH = \frac{E_H + 0,06 \text{ pH}}{0,03}.$$

Elle permet de voir que les cultures glucosées, tant normales qu'aérées, se terminent également en zone d'oxydation [$rH = 16$] (fig. 2), bien qu'elles diffèrent sur un point essentiel ; la mortalité

des germes des cultures glucosées normales contraste, en effet, avec l'exubérance des cultures glucosées aérées.

2^o *Consommation du glucose, taux minimum d'azote et rendement.*

La consommation du glucose a atteint 14,8 g. p. 1.000 ; alors

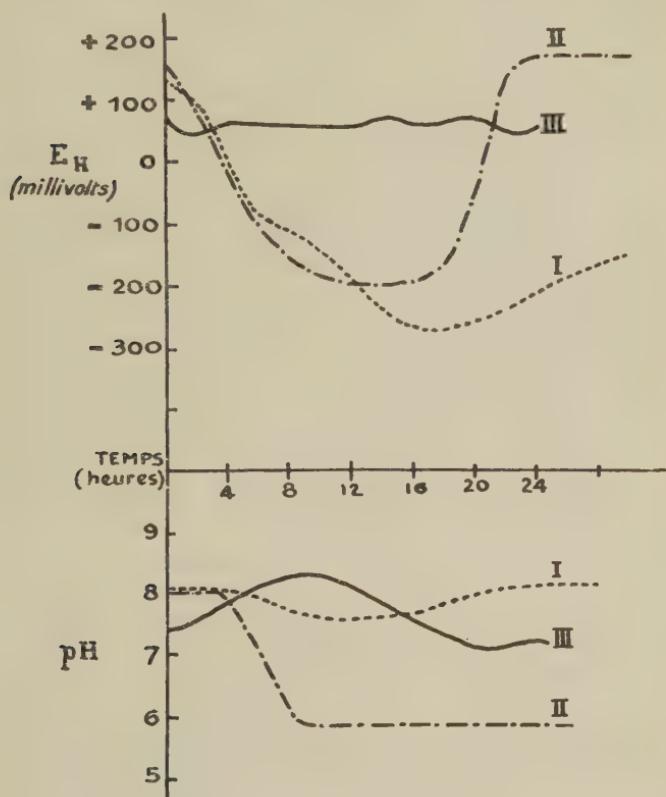


FIG. 1. — Variation du E_H et du pH des cultures normales en eau peptonée non glucosée (courbes 1) et glucosée (courbes 2), et d'une culture aérée en solution glucosée tamponnée (courbes 3).

que dans les milieux témoins non aérés, la quantité de glucose fermenté n'a jamais dépassé 4 g., et ceci pour un taux de N total voisin de 0,1 p. 1.000.

Ce taux d'azote nous est apparu comme le minimum compatible avec une croissance satisfaisante. Il n'est pas indifférent, d'ailleurs, d'utiliser à ce même taux des sources de N diverses (par exemple l'asparagine seule est moins favorable que la peptone Uclaf qui est particulièrement riche en N aminé).

Le rendement moyen est de même ordre qu'en eau peptonée normale non glucosée « aérobiose », soit un peu moins de 5 milliards de germes par centimètre cube ; il est environ quatre fois plus faible dans le milieu témoin non aéré.

3° *Caractères des vibrions cholériques récoltés en aérobiose stricte.*

a) *Morphologie.* — D'aspect nettement plus grêle que les

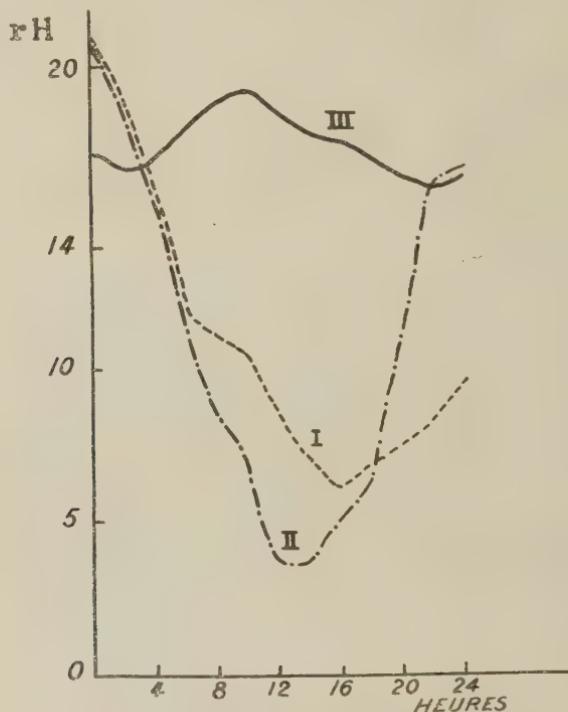


FIG. 2. — Variation du rH (même légende que figure 1).

vibrions de même âge cultivés en milieux azotés usuels, les éléments se présentent rarement à l'état isolé : ils sont le plus souvent peu mobiles, parce que associés en chaînes formant de longs filaments flexueux. De ce fait, il est difficile de les numétrer à l'hématimètre, et les récoltes sont plus aisément évaluées par pesée des cultures après centrifugation, lavage et dessiccation. Si les formes filamenteuses prédominent, on constate souvent une proportion assez importante de formes arrondies (*arthrospores* de Hueppé) qu'il est tout à fait rare de rencontrer après

vingt-quatre heures dans les cultures normales, où elles n'apparaissent qu'après quatre jours et plus.

En somme, l'aspect microscopique des cultures aérées en vingt-quatre heures se rapproche de celui des fragments de voile des cultures normales plus âgées. Il est à noter que ce voile, qui n'apparaît en surface qu'après la période de réduction maxima, quand le potentiel moyen de la culture tend vers la neutralité [1], représente aussi les régions les plus oxygénées des cultures en milieux liquides « aérobies ».

b) *Teneur en azote total.* — Alors que les vibrios cholériques cultivés en milieux usuels non glucosés (gélose nutritive, bouillon en eau peptonée) ont une teneur en N total voisine de 12 p. 100 (d'après les chiffres de J. Blass [3] aussi bien que les nôtres), ce taux s'est abaissé dans nos cultures en milieux glucosés strictement aérobies jusqu'à 2,6 p. 100 lorsque la seule source d'azote était l'asparagine à très faible dose (1 p. 1.000). Il se tient le plus souvent aux environs de 5 p. 100. Ce pourcentage abaissé montre que la structure chimique est en relation avec le métabolisme du germe et que celui-ci renferme une teneur en protides inférieure à celle des vibrios cultivés en milieux azotés non glucosés.

c) *Teneur en antigène O (complexe dit glucido-lipidique).* — L'extraction pratiquée sur les cultures totales (vibrios et liquide surnageant) par l'acide trichloracétique $\frac{N}{2}$ ajouté à volume égal, nous a permis de doser le complexe dit glucido-lipidique [6].

Rappelons tout d'abord que la souche utilisée (V. Hanoi VII du type Inaba S), cultivée sur gélose peptonée, fournit un rendement habituel maximum de 5 p. 100 en glucide-lipide purifié suivant la technique de Boivin [8] (dialyse, précipitation à l'alcool, puis à l'acétone et lavage à l'éther).

Cette même souche nous avait fourni un rendement double [9] par la technique de préparation de la toxine en milieux glucosés que nous avons décrite avec P. Noël-Bernard [5] et ceci avec une consommation de glucose ne dépassant jamais 5 p. 1.000.

Par la technique de culture en milieux glucosés strictement aérobies ce rendement s'est élevé à 12 et même 16 p. 100.

Une étude immunochimique approfondie de ce complexe antigénique permettra seule de le comparer avec les deux complexes glucido-lipidiques cholériques extraits soit des vibrios cholériques cultivés en milieux solides usuels, soit de la toxine cholérique ; complexes que nous avons déjà étudiés avec P. Grabar [10] en utilisant la méthode quantitative de dosage des anticorps.

Indiquons, dès maintenant que la teneur en azote du complexe glucido-lipidique des cultures aérées apparait très inférieure à celle des complexes glucido-lipidiques cholériques précédemment étudiés (2 p. 100 au lieu de 5 p. 100).

4^o *Teneur en toxine.*

Le liquide surnageant des cultures aérées centrifugées après vingt-quatre heures, à 37°, est (après stérilisation par le toluène) régulièrement toxique.

Il est facile de mettre en évidence dans cette toxine strictement aérobio les deux éléments dont nous avons déjà signalé (avec P.-Noël Bernard [6] et avec Grabar [11]), la présence dans la toxine cholérique normale : à savoir le complexe dit glucido-lipidique (qui s'identifie avec l'antigène O isolé par la technique d'extraction indiquée ci-dessus) et la substance hypothermisante à petite molécule (qu'on peut extraire soit par ultra-filtration [12], soit par voie chimique [13]).

Les proportions relatives de ces deux éléments toxiques paraissent à première vue semblables à celles qu'on observe dans la toxine préparée suivant la technique de P. Noël-Bernard et J. Gallut [5]. Il est à noter que le comportement des vibrions « non proliférants en milieu glucosé, s'il diffère quant au pH, est du point de vue du potentiel d'oxydo-réduction [1] sensiblement le même que celui des vibrions aérés. En effet, dans les 2 cas, le E_H est positif, quoique à des degrés divers, ce qui, malgré la différence de réaction (pH 5,8 contre 7,0 à 8,5) se traduit par un rH de même ordre de grandeur (+ 15 à + 20) [fig. 2]. On voit donc qu'en ce qui concerne la toxicité, le mode de culture strictement aérobio confirme l'observation relatée dans notre précédent travail [1] : à savoir que la libération de la toxine cholérique se traduit en milieu glucosé par un E_H positif qui se situe vers + 350 mv. Toutefois, dans le cas présent, le E_H est moins élevé : il ne dépasse pas + 100 mv. ; cette infériorité semble justifiée par le fait que la libération de la toxine a lieu non en phase de mort de tous les vibrions, mais au contraire en coexistence avec une prolifération toujours renouvelée des germes ; prolifération qui, on le sait, tend à produire une baisse de potentiel. Tout se passe donc comme si le potentiel d'oxydo-réduction observé ici constituait un potentiel d'équilibre, dont la valeur, + 100 mv., conforme du reste à cette hypothèse, serait la somme algébrique de + 350 mv., potentiel de l'endotoxine et de — 250 mv., potentiel de la période de croissance maxima.

5^o *Utilisation des peptones.*

Les cultures glucosées aérées dont la réaction a toujours été maintenue au-dessus de pH 7, ne contiennent pas d'indol décelable par la réaction du choléra-rot. Ce n'est qu'au cas où, par défaut d'effet tampon suffisant dans le milieu ou par aération défectueuse, la chute du pH n'a pu être corrigée qu'on peut

mettre en évidence des quantités assez faibles d'indol (choléra-rot faiblement positif, teneur en indol ne dépassant pas 2 mg. par litre), provenant de l'autolyse des vibrions en milieu acide.

CONCLUSIONS.

Nous avons résumé dans un tableau les principales caractéristiques des cultures du vibrion cholérique en milieux glucosés strictement aérobies et non aérés en comparaison, d'une part avec une culture de la même souche en milieu liquide normal (eau peptonée Uclaf), et, d'autre part, avec une émulsion du vaccin anticholérique usuel (vaccin chauffé).

Quelques caractères des vibrions cholériques suivant le mode de leur culture (vingt-quatre heures à 37°).

	CULTURE en eau glucosée tamponnée		CULTURE en eau peptonée normale	ÉMULSION de culture sur gélose nutritive (vaccin)
	Aérée	Normale		
E_H limites (mv.) :				
Supérieur	+ 81	+ 150	+ 150	
Inférieur	+ 42	- 200	- 250	
pH limites :				
Supérieur	8,32	8,0	8,2	8,0
Inférieur.	7,05	6,6	7,6	Départ.
Vibrions par centimètre cube :				
Milligramme (sec).	0,909	0,240	0,914	0,750
Nombre $\times 10^6$	4.848	1.280	4.874	4.000
Glucose consommé (p. 100) . . .	1,48	0,33	0	0
Azoté total (mg. par cm³) :				
Surnageant	0,109	0,150	3,523	0
Vibrions	0,063	0,024	0,109	0,106
Teneur en N des vibrions (p. 100) . . .	7,0	10,1	13	15
Antigène O (mg. par cm ³)	0,137	0,030	0,065	0,035
Teneur en antigène O des vi- brions (p. 100)	15,0	12,5	7,1	4,6
Teneur en N de l'antigène O (p. 100)	2		5	5

Cette deuxième comparaison est motivée par le fait que Linton et Jennings, dans le travail mentionné plus haut [4], ont préconisé l'utilisation des cultures aérées pour la fabrication directe du vaccin anticholérique.

Cette méthode présenterait certainement l'avantage d'une grande simplification de technique, puisqu'il suffirait de stériliser

la culture elle-même (soit par addition d'un antiseptique, soit par chauffage) pour qu'elle constitue une émulsion vaccinale immédiatement utilisable. On éviterait ainsi les opérations plus nombreuses que comporte la préparation du vaccin à partir des cultures en milieu solide.

Nos résultats montrent, en outre, à l'appui de cette utilisation que la densité microbienne obtenue en milieu glucosé aéré est très convenable, et que les cultures ont une teneur en complexe glucido-lipidique double de celle des cultures en eau peptonée normale, et quadruple de celle des émulsions vaccinales courantes.

Cette teneur élevée en un complexe qui représente à la fois l'antigène O et l'endotoxine cholérique (sinon en totalité, du moins pour une grande partie [6], si elle est un avantage du point de vue antigénique, peut par contre être gênante du point de vue toxique ; et il conviendrait sans doute de réduire les doses vaccinantes en conséquence si elles s'avéraient mal supportées.

Par contre, le liquide surnageant de ces cultures aérées ne contenant que très peu d'azote et un très léger excès de glucose ne semble pas susceptible d'apporter un inconvénient quel conque à son emploi comme véhicule des bactéries tuées.

Toutefois, les différences que nous avons notées, tant dans la morphologie des germes, que dans leur structure chimique (diminution du taux des protides) demandent une étude approfondie du pouvoir antigène des vibrions ainsi cultivés, pour qu'il soit possible de conclure sûrement à la supériorité de l'emploi de l'aérobiose « de contrainte » en milieu glucosé pour la fabrication du vaccin anticholérique.

Le caractère particulièrement artificiel de ce genre de culture ne saurait, en effet, nous échapper ; c'est pourquoi nous envisagerons les résultats présents également comme un terme de comparaison, en relation avec une étude ultérieure, analogue, mais pratiquée dans des conditions toutes différentes, et se rapprochant le plus possible de celles que fournit au vibron cholérique son milieu biologique normal : l'intestin grêle de l'homme.

En résumé, ce travail confirme les notions déjà établies par différents auteurs [2, 3, 4] et nous-même [1] sur l'utilisation du glucose par le vibron cholérique en milieux aérés. Nous avons vérifié que cette utilisation optima a lieu à une réaction alcaline très voisine de la neutralité (pH 7 à 8) et à un potentiel d'oxydoréduction légèrement positif (E_{H^+O} à + 100 mv.). Ceci confirme l'aptitude du vibron cholérique, germe normalement anaérobie facultatif, à s'adapter à une aérobiose stricte pendant sa phase de croissance.

On retrouve dans ces cultures les deux fractions toxiques que nous avons déjà signalées [6, 9, 11, 12, 13] dans la toxine cholé-

rique obtenue en milieux glucosés non aérés. Le mode de l'utilisation du glucose, par combustion au lieu de fermentation, pendant la période de croissance, est donc sans influence sur la libération de la toxine ; celle-ci paraît être sous la seule dépendance du nombre des germes et de leur nutrition ; elle se fait dans tous les cas sous un potentiel d'oxydo-réduction positif.

Le rendement en vingt-quatre heures, à 37°, de telles cultures en milieux aérés glucosés et ne contenant pas d'azote autre que celui apporté par l'ensemencement, est sensiblement égal en nombre mais double en antigène O de celui obtenu dans le même temps en eau peptonée normale (milieu d'enrichissement type du vibron cholérique), contenant trente fois plus d'azote.

Toutefois, les modifications observées dans la morphologie des germes (prédominance de formes filamenteuses et présence « d'arthrospores ») et leur composition (teneur en N total abaissée) laissent supposer des modifications parallèles dans leur structure antigénique. Cette étude demande donc à être poursuivie sur ce point pour confirmer les avantages certains que présente par ailleurs cette technique pour la fabrication du vaccin anti-cholérique, et éventuellement d'autres vaccins utilisant des bactéries d'un métabolisme analogue à celui du vibron cholérique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GALLUT (J.): *Ces Annales*, 1947, **73**, 154.
- [2] HIRSCH (J.): *Zeitschr. Hyg. u. Infektionskr.*, 1929, **109**, 387.
- [3] BLASS (J.): *Thèse Sciences*, Paris, 1946.
- [4] LINTON (R. W.) et JENNINGS (R. K.): *Arch. of Bioch.*, 1944, **3**, 419 et **429**, et **4**, 311.
- [5] BERNARD (P. Noël) et GALLUT (J.): *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 10 et 11.
- [6] BERNARD (P. Noël) et GALLUT (J.): *Ces Annales*, 1945, **71**, 65.
- [7] BLASS (J.): *Ibid.*, 1946, **72**, 230.
- [8] Boivin (A.): *Rev. Immunol.*, 1935, **1**, 553.
- [9] GALLUT (J.): *Ces Annales*, 1943, **69**, 123.
- [10] GALLUT (J.) et GRABAR (P.): *Ibid.*, 1943, **69**, 250 et 307.
- [11] GRABAR (P.) et GALLUT (J.): *C. R. Acad. Sci.*, 1943, **217**, 559.
- [12] GALLUT (J.) et GRABAR (P.): *Ces Annales*, 1945, **71**, 83.
- [13] GRABAR (P.) et GALLUT (J.): *Ibid.*, 1945, **71**, 321.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA MORPHOLOGIE DU BACILLE DE HANSEN

par R. CHAUSSINAND (*).

Institut Pasteur. Service de la lèpre.

L'examen de très nombreuses préparations de produits pathologiques provenant de lèpres à tous stades, ainsi que des essais de culture et d'inoculation aux animaux effectués pendant une douzaine d'années, nous ont permis d'étudier la morphologie du bacille de Hansen dans les conditions les plus variées. Nous avons pu observer ainsi les faits suivants :

Le bacille de Hansen montre dans l'organisme humain quatre formes bacillaires distinctes que nous désignons sous les noms de : *Bacille normal*, *Bacille en involution*, *Bacille en division*, *Bacille en dégénérescence*.

BACILLE NORMAL

Bâtonnet immobile, homogène, de forme cylindrique, se colorant uniformément en rouge vif par la méthode de Ziehl. Il est généralement rectiligne, mais peut se montrer légèrement incurvé. Quelquefois ses extrémités se terminent en pointe. Les bacilles normaux se distinguent en bacilles longs, bacilles moyens, bacilles courts et bacilles fins. Leur longueur varie entre 1,5 - 4 - 6 microns, et leur largeur entre 0,2 - 0,35 - 0,45 microns.

Les bacilles longs s'observent particulièrement, et toujours relativement en petit nombre, dans les lésions cutanées lépro-mateuses, notamment chez les malades non traités ; ils représentent probablement des formes bacillaires susceptibles de passer au stade de division. Les bacilles moyens se rencontrent en grande majorité dans toutes les lésions lépreuses. Les bacilles courts sont moins fréquents, mais peuvent également se trouver dans toutes les lésions. Les bacilles fins se voient dans les lésions lépromateuses évolutives et peuvent vraisemblablement être interprétés comme des formes bacillaires jeunes.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 9 janvier 1947.

BACILLE EN INVOLUTION.

Bacille volumineux, gonflé, incurvé, rarement ramifié, se terminant souvent par un renflement en massue. Ces bacilles se colorent, en général, uniformément en rouge vif par la méthode de Ziehl, mais il peuvent montrer une coloration rouge plus foncée. Quelquefois, le centre de la partie gonflée ne se colore qu'en rose pâle.

Nous estimons qu'il s'agit de formes d'involution. En effet, ces bacilles ne se rencontrent que rarement dans les préparations pathologiques et ne s'observent alors que chez des lépreux à allergie marquée, chez lesquels les bacilles ont à lutter contre les réactions tissulaires. Ainsi, les bacilles en involution se trouvent surtout dans les macules des malades atteints de lèpre nerveuse tuberculoïde non évolutive. Chez les lépreux nerveux cutanés typiques traités et en voie de guérison, la présence de cette forme bacillaire est également reconnue. Par contre, les lésions des lépreux lépromateux, anergiques, ne contiennent jamais de bacilles en involution.

Dans les essais de culture du bacille de Hansen, quand aucune multiplication des germes ne s'était produite, nous avons vu quelquefois des bacilles normaux passer au stade d'involution avant de disparaître. De même, chez les animaux inoculés de lépromes par voie sous-cutanée, nous avons noté à plusieurs reprises la transformation de bacilles normaux en bacilles invoulés, notamment quand l'élimination ou la destruction des germes injectés se révélait lente.

A notre avis, les bacilles en involution sont à considérer comme une forme de souffrance du bacille de Hansen et rien n'autorise, jusqu'à présent, à les interpréter avec Paldrock (1) comme une forme de reproduction.

BACILLE EN DIVISION.

Bacille composé de segments de forme et le plus souvent de taille identiques, alignés bout à bout et représentant une série linéaire droite ou légèrement incurvée, de longueur variable. Les segments bacillaires sont homogènes et se colorent uniformément en rouge vif par la méthode de Ziehl. Ils sont séparés entre eux par un petit intervalle transversal non colorable. Les bacilles en division, sont en général composés de deux ou, moins souvent (18 p. 100 environ), de trois segments.

Cette forme bacillaire se montre relativement rare et se note surtout dans les préparations provenant de lèpres évolutives.

(1) PALDROCK, *III^e Conf. intern. Lèpre, Strasbourg, 1925*, 138.

Nous estimons que le bacille segmenté représente le germe de la lèpre au stade de reproduction par division directe (scissiparité) et qu'ultérieurement, les segments, après avoir perdu leur contact, se dispersent et deviennent des bacilles normaux.

Les rares auteurs qui mentionnent cette forme bacillaire, la considèrent comme une forme de dégénérescence préliminaire de la forme granuleuse. Les constatations suivantes s'opposent à cette façon de voir.

Si le bacille segmenté représentait un stade intermédiaire entre le bacille normal et le bacille granuleux, cette forme bacillaire se montrerait beaucoup plus fréquente dans les préparations provenant de malades en traitement, chez lesquels on constate une augmentation notable des bacilles granuleux. En outre, on observerait probablement des bacilles segmentés contenant déjà quelques granulations. Or, jamais une seule granulation n'a pu être vue sur un bacille segmenté.

Chez les lépreux évolutifs non traités, les bacilles en division se notent plus fréquemment et se rencontrent en plus grand nombre que chez les lépreux en traitement. Dans les lèprous nerveuses cutanées non évolutives, le bacille en division n'est, pour ainsi dire, jamais vu.

Au début de la formation des globi dans les macrophages, où la multiplication bacillaire se révèle intense et où la dispersion des germes est entravée par la membrane cellulaire, les bacilles gardent la position et l'alignement occupés au stade de reproduction et l'agglomération des germes paraît être formée de bacilles en division accolés les uns aux autres.

Dans nos essais de culture du bacille de Hansen, quand, après onze mois d'incubation, une culture médiocre a pu être obtenue (2), elle était constituée par de minuscules colonies de bacilles normaux, homogènes, et, de la périphérie de ces colonies, partaient de nombreuses trames légèrement contournées paraissant composées de bacilles en division groupés parallèlement. Par contre, dans les tubesensemencés où, après la même durée d'incubation, aucune culture ne s'était produite, nous ne constatons exclusivement que la présence de rares bacilles granuleux, en dégénérescence et de quelques bacilles en involution.

Enfin, dans l'inoculation sous-cutanée des bacilles de Hansen aux animaux (3), nous avons toujours observé, avant leur disparition, le passage des bacilles normaux au stade granuleux de dégénérescence, sans jamais noter la formation de bacilles en division.

En nous basant sur ces constatations, nous estimons que le

(2) R. CHAUSSINAND, *Intern. J. Leprosy*, 1941, 9, 69.

(3) R. CHAUSSINAND, *Intern. J. Leprosy*, 1941, 9, 203.

bacille segmenté représente le germe de la lèpre au stade de reproduction par division directe et qu'il doit être désigné sous le nom de bacille en division.

BACILLE EN DÉGÉNÉRESCENCE.

Les bacilles en dégénérescence s'observent dans les préparations pathologiques sous quatre formes distinctes qui représentent les stades progressifs de la désintégration du germe de la lèpre.

En premier lieu, on constate l'apparition dans le corps bacillaire normal d'une ou de plusieurs granulations de dimensions et de formes irrégulières se colorant en rouge légèrement plus foncé par la méthode de Ziehl. Le corps bacillaire même reste coloré en rouge vif. Le nombre des granulations observées est variable. Nous avons noté les pourcentages suivants : une granulation, 8 p. 100 ; deux granulations, 53,8 p. 100 ; trois granulations, 34,8 p. 100 ; quatre granulations, 3,1 p. 100 ; cinq granulations, 0,3 p. 100. Le terme « granulation », employé par la majorité des auteurs, nous paraît d'ailleurs impropre. Une « granulation » est toujours de forme plus ou moins arrondie. Or, au début de leur formation, les « granulations » du bacille de la lèpre, vues à un fort grossissement montrent fréquemment, dans le sens longitudinal, des extrémités à aspect rétracté et fragmenté. De ce fait, les « granulations » donnent souvent, à ce stade, une image microscopique se rapprochant de la forme quadrangulaire.

Ensuite, le corps bacillaire perd graduellement la faculté de se colorer et le bacille semble uniquement formé d'une chaînette de granulations séparées entre elles par de petits espaces non colorés.

Puis les chaînettes se désagrègent et les granulations colorées en rouge perdent leur contact et se dispersent.

Les granulations isolées se transforment alors en poussière légèrement colorée en rose et disparaissent finalement sans laisser de traces.

La majorité des auteurs considèrent ces formes granuleuses comme des formes de dégénérescence et admettent que les poussières provenant de la désagrégation des granulations représentent le dernier stade visible de la désintégration du germe de la lèpre.

Quelques auteurs avec Much, Marchoux, Klingmüller et de Mello estiment toutefois que les granulations sont virulentes et résistantes.

D'autres, tels que Markianos, Vaudremer, Cantacuzène, Hoffmann et Manalang, croient que la granulation est le stade initial d'un ultra-virus lépreux.

Nous sommes d'avis qu'il s'agit de formes de dégénérescence.

En effet, les formes granuleuses augmentent parallèlement avec l'amélioration des lésions cutanées chez les malades en traitement. Notamment, chez les lépromateux en voie de « blanchiment », on peut ainsi suivre la transformation des globi dont les bacilles passent progressivement du stade normal à l'état de poussière. De même, dans les essais de culture, quand aucune multiplication des germes ne s'est produite, nous constatons que les bacilles normaux passent par tous les stades de dégénérescence ci-dessus décrits avant de disparaître. Nous avons pu observer le même phénomène chez les animaux inoculés par voie sous-cutanée avec des bacilles de Hansen.

La culture et l'inoculation du bacille de la lèpre n'ayant pu jusqu'à présent, être complètement réalisées, il est évidemment impossible de déterminer si les granulations sont susceptibles de devenir le point de départ de nouveaux germes normaux. Mais il est certain que morphologiquement et au point de vue de la résistance aux agents physiques, les granulations ne présentent aucune des caractéristiques reconnues aux spores.

En ce qui concerne l'existence d'un ultra-virus lépreux, aucune preuve n'a pu être apportée en faveur de cette hypothèse. Nous n'avons jamais pu obtenir une culture en employant la technique de Vaudremer (4), qui consiste àensemencer un filtrat sur bougie L3 de lépromes ou de rate lépreuse dans du liquide de Raulin, ayant servi à la culture de l'*Aspergillus fumigatus*. Lors de ces essais, nous avons, par contre, observé que des bacilles lépreux normaux pouvaient traverser des bougies L3 neuves et intactes. Des constatations analogues ont été faites par Walker et Sweeney (5), avec le bacille de Hansen et par Choucroun et Peltier (6), avec le bacille de Stefansky. A notre avis, les formes granuleuses du bacille de Hansen doivent être considérées comme des formes de dégénérescence et rien n'autorise à les interpréter comme le stade initial d'un hypothétique ultra-virus lépreux.

DISPOSITION DU BACILLE DE HANSEN DANS LES PRODUITS PATHOLOGIQUES.

Les bacilles normaux, les bacilles en division et les bacilles en dégénérescence peuvent se rencontrer dans les préparations pathologiques, soit à l'état isolé, soit groupés en amas ou en globi. Les bacilles en involution ne s'observent qu'isolés ou en amas.

Les amas sont des formations plus ou moins lâches de bacilles, soit situés sans ordre et orientés dans tous les sens, soit groupés

(4) A. VAUDREMER, et C. BRUN, *Presse méd.*, 1935, **92**, 1812.

(5) E. L. WALKER et M. A. SWEENEY, *J. Inf. Dis.*, 1935, **56**, 97.

(6) N. CHOUCROUN et M. PELTIER, *C. R. Acad. Sci.*, 1935, **200**, 785.

en partie parallèlement. En général, on reconnaît bien la forme de chaque bacille dans les préparations colorées.

Les *globi* sont des formations serrées de bacilles alignés bout à bout et groupés parallèlement. Dans les *globi* composés de bacilles normaux, les germes sont agglomérés entre eux et constituent une masse compacte dans laquelle il est le plus souvent impossible de distinguer les corps bacillaires. Les petits et moyens *globi* ont une origine intracellulaire et sont généralement de forme arrondie ou ovale. Les gros *globi* affectent d'ordinaire une disposition cylindrique allongée qui provient de leur développement dans les espaces lymphatiques.

RÉSUMÉ

Le germe de la lèpre montre dans l'organisme humain quatre formes bacillaires distinctes que nous désignons sous les noms de :

Bacille normal : Bâtonnet immobile, homogène se colorant uniformément en rouge vif par la méthode de Ziehl. Les bacilles normaux se distinguent : en bacilles longs, bacilles moyens, bacilles courts et bacilles fins.

Bacille en involution : Bacille volumineux de forme incurvée, rarement ramifié, se terminant souvent par un renflement en massue. Ces bacilles ne se colorent pas toujours uniformément par la méthode de Ziehl. Le bacille en involution est à considérer comme une forme de souffrance du germe de la lèpre.

Bacille en division : Bacille composé de deux ou de trois segments homogènes de forme et le plus souvent de taille identiques, séparés entre eux par un petit intervalle transversal non colorable. Cette forme bacillaire représente le germe de la lèpre au stade de reproduction par division directe (scissiparité).

Bacille en dégénérescence : Se rencontre sous quatre formes distinctes qui représentent les stades progressifs de la désintégration du bacille de Hansen :

1^o Apparition dans le corps bacillaire normal d'une ou de plusieurs granulations se colorant en rouge légèrement plus foncé par la méthode de Ziehl ;

2^o Le corps bacillaire perd graduellement la faculté de se colorer et le bacille semble alors uniquement formé par une chaînette de granulations séparées entre elles par de petits espaces non colorés ;

3^o Les chaînettes se désagrègent et les granulations se dispersent ;

4^o Les granulations isolées se transforment en poussières, puis disparaissent sans laisser de traces.

Aucune preuve n'a pu être apportée, jusqu'à présent, en faveur de l'existence d'un ultra-virus lèpreux.

IRRADIATION ULTRAVIOLETTE DE BACTÉRIOPHAGES EN COURS DE MULTIPLICATION INTRA-CELLULAIRE (*)

par RAYMOND LATARJET et SALVADOR LURIA.

INTRODUCTION.

La multiplication des bactériophages pose un problème qui, jusqu'ici a résisté à toutes les tentatives. La lyse artificielle de la bactérie infectée, obtenue par le lysosome, n'a pas permis de retrouver les phages supposés présents au moment de cette lyse. La rupture mécanique de la bactérie infectée a également conduit à un échec. La microscopie électronique n'a rien révélé elle non plus, la bactérie étant totalement opaque, dans l'état actuel de la technique.

Ce problème présente un intérêt qui déborde le cadre des phages eux-mêmes. Bien que ceux-ci se comportent comme des « virus bactériens », il existe sans doute de profondes différences entre eux et les virus des maladies animales et végétales. Toutefois, les plus petits phages, de diamètre moyen compris entre 10 et 20 μ , semblent présenter une organisation très simple et une structure chimique riche en nucléo-protéides, qui les apparentent aux petits virus cristallins de taille semblable. La complication de l'organisation avec la taille fournit une analogie supplémentaire avec les virus. Toute acquisition relative à la multiplication des phages apporterait donc peut-être une contribution utile au problème général de la multiplication des virus, qui, lui-même, est peut-être lié au problème, d'importance biologique plus grande encore, de la duplication des facteurs héréditaires spécifiques (gènes et enzymes) au moment de la division cellulaire.

Des travaux récents ont fait naître l'espoir d'attaquer ce problème par une voie indirecte, en irradiant des bactéries infectées, au cours de la période latente (1).

PRINCIPE DE LA MÉTHODE.

Il repose sur les considérations suivantes :

1° Une bactérie infectée représente un centre infectieux, c'est-à-dire que, ensemencée sur gélose en présence d'un excès de

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 5 décembre 1946.

(1) On désigne sous ce nom, dans la terminologie américaine, la période qui s'étend entre l'infection et la lyse d'une bactérie.

bactéries sensibles, elle donne une plage claire, témoin de la multiplication du phage, et de l'infection des bactéries environnantes.

2^o Un phage nu peut être inactivé par des rayonnements appropriés. Avec des rayons ultraviolets de courte longueur d'onde (2537 Å), l'inactivation est produite par un seul photon (Latarjet et Wahl, 1945). La « courbe de survie » des phages en fonction de la dose de rayonnement est une exponentielle.

3^o La multiplication des phages peut se produire au sein d'une bactérie récemment stérilisée par irradiation (Anderson, 1944, Rouyer et Latarjet, 1946).

Il en résulte que, si l'on irradie une bactérie contenant un phage, on doit pouvoir en supprimer le pouvoir infectieux par inactivation directe du phage au sein de la bactérie. La « courbe de survie » des bactéries infectées sera également une exponentielle voisine de la courbe des phages nus. Le centre infectieux sera un petit peu plus résistant que le phage nu par suite de la protection du phage par le protoplasme bactérien. Si la bactérie contient plusieurs phages — on sait qu'au moment de la lyse chaque bactérie en libère un grand nombre pouvant atteindre plusieurs centaines (Delbrück, 1945) — la suppression du pouvoir infectieux exigera la destruction de tous ces phages, et la courbe de survie deviendra une sigmoïde de Poisson, dont l'ordre n sera égal au nombre de phages présents dans la bactérie au moment de l'irradiation. On posséderait ainsi un moyen indirect de compter les phages à l'intérieur de la bactérie, à chaque instant de la période latente, et de suivre ainsi la cinétique de la multiplication.

Si chaque bactérie contient un seul phage, la courbe de survie est une exponentielle répondant à l'équation

$$y = e^{-\alpha D} \quad (1)$$

où y est la fraction survivante, D la dose, et α une constante définissant la sensibilité.

Si chaque bactérie contient n phages actifs de même sensibilité, et si elle demeure un centre infectieux aussi longtemps qu'elle contient au moins un phage actif, la courbe de survie répond à l'équation :

$$y = 1 - (1 - e^{-\alpha D})^n \quad (2)$$

Les courbes correspondant aux diverses valeurs de n sont données dans la figure 1. Il suffirait de comparer à ces courbes la courbe expérimentale de survie établie à un instant donné de la période latente, pour en déduire la valeur n du nombre de phages actifs présents dans chaque bactérie à cet instant.

EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES.

Une série d'expériences préliminaires ont été effectuées pour contrôler le bien-fondé de ces considérations. La bactérie utilisée,

E. coli souche B, en suspension dans un milieu synthétique et transparent, est stérilisée par la radiation 2537 A selon la courbe 1 de la figure 2, tracée en coordonnées semi-logarithmiques. Cette courbe est une droite (exponentielle) avec un changement de pente indiquant la présence de 1 p. 100 d'éléments plus résistants. Le phage nu T_2 est inactivé selon la courbe 2. Le centre infectieux constitué par la bactéries B contenant un seul phage T_2 est inactivé aussitôt après l'infection, c'est-à-dire avant toute multiplication, selon la courbe 3 qui, ainsi que prévu ci-dessus, est très proche de 2 et n'en diffère que par une résistance un peu accrue. Le fait de base, à savoir que la disparition du pouvoir infectieux est dû à l'inactivation du phage, et non pas à un facteur bactérien est prouvé par deux autres expériences :

a) Le phage T_7 est plus résistant que T_2 (courbe 4). La même bactéries B infectée avec un seul phage T_7 , donne la courbe 5, très proche de 4. S'il s'agissait d'un facteur bactérien, on devrait retrouver la courbe 3.

b) Si, au lieu de B, on utilise le mutant B/r (Witkin, 1946) résistant aux radiations, mais également sensible à T_2 et T_7 , on retrouve les courbes 3 et 5.

Si maintenant, l'on infecte B avec, en moyenne, 5 phages (infection multiple) on obtient, aussitôt que possible après l'infection, la courbe 4 de la figure 4. Cette courbe est approximativement une sigmoïde d'ordre 5. Si l'on met en moyenne 15 phages par bactéries, on obtient la courbe 4+ qui est approximativement une sigmoïde d'ordre 15. Ainsi, cette méthode indirecte permet bien de se faire une idée du nombre moyen de phages par bactéries infectée.

EXPÉRIENCES ET RÉSULTATS.

Les expériences ont consisté à infecter une culture de la bactéries B en phase de croissance (5 à $10 \cdot 10^7$ bactéries par centimètre cube à 37°, milieu synthétique) avec un nombre connu de phages T_2 , de manière à réaliser une infection, soit simple, soit multiple. Aussitôt après l'infection, les phages restés libres sont éliminés par l'anti-sérum spécifique ; la culture est alors diluée suffisamment pour éviter toute absorption du rayonnement par la suspension irradiée. La culture étant alors maintenue à 37°, des échantillons sont prélevés à des instants donnés, irradiés et ensemencés pour numération des centres infectieux survivants. La période étudiée s'étend de deux à dix-huit minutes après l'infection, la lyse survenant après vingt et une minutes. On irradie chaque fois plusieurs échantillons avec des doses différentes, de manière à construire la courbe de survie correspondant à l'instant choisi.

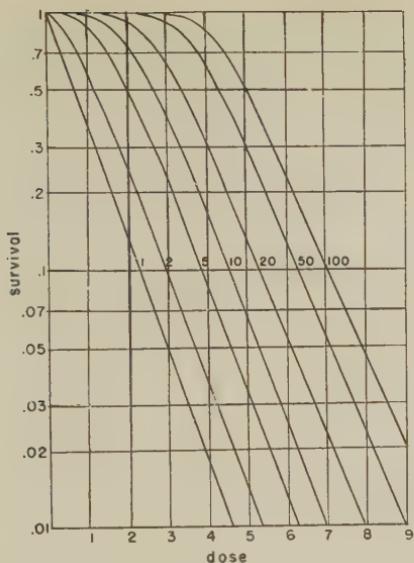


FIG. 1. — Courbes théoriques de survie correspondant à la formule 2. Doses en unités arbitraires. Les nombres portés sur les courbes représentent les valeurs correspondantes de n dans la formule.

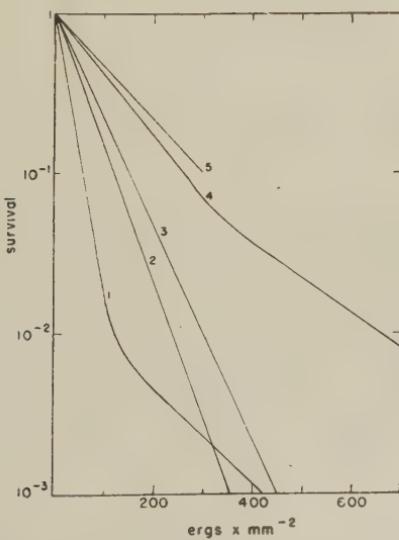


FIG. 2. — Courbes de survie et d'inactivation : 1, bactéries B; 2, phages T_2 ; 3, bactéries infectées par un phage T_2 , deux minutes après l'infection; 4, phages T_7 ; 5, bactéries infectées par un phage T_7 , trois minutes après l'infection.

a) INFECTION SIMPLE (fig. 3). — Dans ce cas, une bactérie sur 5 environ était infectée, proportion qui ne laissait qu'une probabilité insigne d'infection multiple. Des doses variant de 50 à 1.280 ergs \times mm $^{-2}$ ont été administrées de minute en minute au cours d'un grand nombre d'expériences qui ont fourni au total 242 points expérimentaux. Pour des raisons évidentes, une certaine variabilité s'est manifestée d'une expérience à l'autre, aussi a-t-on fait une moyenne des résultats relatifs à chaque point. Ces résultats sont indiqués par le réseau des courbes de la figure 3, dont les nombres indiquent l'instant de l'irradiation.

Au tout début, trois et quatre minutes, les courbes sont expo-

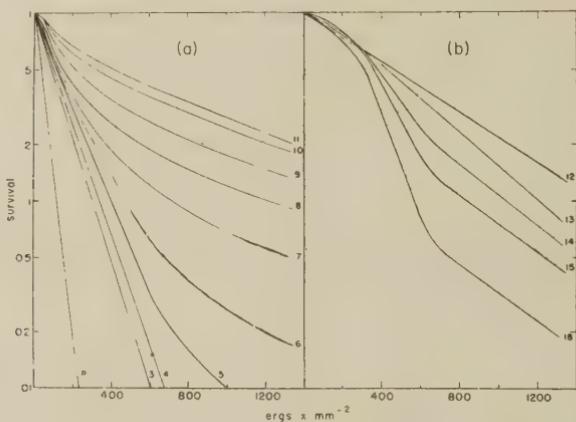


FIG. 3. — Infection simple avec T_2 . Courbes de survie des centres infectieux, de minute en minute, entre trois et dix-huit minutes après l'infection. P , est la courbe relative au phage *nu*.

nentielles. À partir de cinq minutes apparaît à l'extrémité de la courbe une légère concavité tournée vers le haut. Jusqu'à onze minutes, le phénomène le plus frappant est une augmentation progressive de la résistance au rayonnement. Vers la douzième minute, cette tendance s'inverse. La résistance aux fortes doses se met à diminuer, et une concavité tournée vers le bas apparaît au début de la courbe, transformant celle-ci en sigmoïde. Vers quinze à dix-huit minutes, la courbe a sans conteste un type sigmoïde de multiplicité élevée.

b) INFECTION MULTIPLE (fig. 4). — Des expériences analogues aux précédentes ont été effectuées sur des suspensions dans lesquelles on avait introduit une quantité plus grande de lysat de bactériophage, de manière à infecter chaque bactérie avec plusieurs phages. Au total, 96 résultats ont été obtenus, dont on

ne peut faire ici la moyenne, la multiplicité, c'est-à-dire le nombre moyen de phages par bactérie, variant d'une expérience à l'autre. La figure 4 donne quelques résultats d'expériences individuelles. Ici encore, la résistance des centres infectés commence par augmenter dans les premières minutes, pour ensuite diminuer. A la fin, on obtient des courbes très semblables à celles de l'infection simple. Ceci concorde avec le fait connu que le résultat final est le même pour les deux types d'infection, en ce qui concerne, aussi bien le rendement en phages que la durée de la période latente (Delbrück et Luria, 1942).

L'analyse des courbes de la figure 4 révèle un fait important :

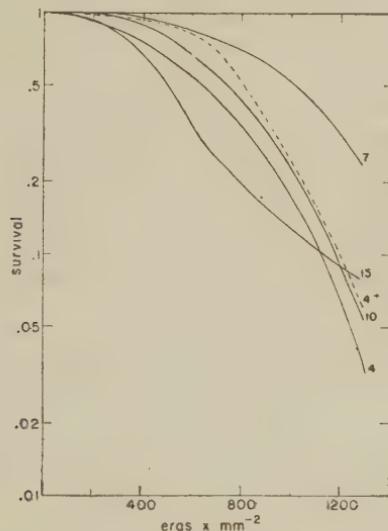


FIG. 4. — Infection multiple avec T_2 . Les courbes se rapportent à des expériences individuelles, les nombres indiquant les moments de l'irradiation. La multiplicité est égale à 5 sauf pour la ligne brisée où elle est égale à 15.

tous les phages fixés, ou, au moins, plusieurs d'entre eux, participent au processus de croissance. Ce fait contredit, dans le cas d'infection par une seule espèce de phage, le principe d'exclusion selon lequel un seul phage peut pousser après avoir occupé une place unique auprès d'un enzyme-clé (Delbrück et Luria, 1942).

INTERPRÉTATION.

Dans le cas de l'infection simple, les courbes de la figure 3 semblent indiquer que pendant les premières minutes, aucun nouveau phage actif n'apparaît, et que la photo-résistance du phage introduit augmente progressivement. Cette augmentation

peut être due à une modification de structure du phage lui-même. Pirie (1946) a en effet montré que les virus semblent différer suivant qu'ils se trouvent à l'état libre ou à l'intérieur de la cellule hôte. On peut également envisager l'accumulation autour du phage de substances absorbant une partie du rayonnement. Par exemple, une couche de 200 $\text{m}\mu$ d'acides nucléiques suffirait à expliquer la différence entre la première courbe et celle de résistance maximum (onze minutes). Cette couche serait compatible avec la quantité de substances nucléiques nécessaires pour fabriquer les 150 phages T_2 qui, en moyenne, sont libérés par la lyse d'une seule bactérie. Des expériences faites avec les rayons X montreront si cette interprétation est exacte.

La concavité vers le haut présentée par l'extrémité des courbes est probablement due aux fluctuations individuelles considérables que présente la croissance, d'une cellule à l'autre. Certaines bactéries ne libèrent que quelques phages ; d'autres plusieurs centaines (Delbrück, 1945). Il est évident que le processus de croissance se poursuit dans des conditions très différentes de vitesse et d'ampleur selon les cellules. Les courbes obtenues, qui traduisent l'ensemble des phénomènes individuels, doivent porter la marque de cette variabilité.

Lorsque le maximum de résistance est atteint, on voit la sensibilité augmenter à nouveau, en même temps que se précise le type sigmoïde des courbes indiquant la présence de plusieurs particules. On peut considérer que, après une dizaine de minutes, la multiplication s'accélère aux dépens de la substance absorbante qui disparaît progressivement. Le fait que le nombre terminal de phages libérés est indépendant du nombre de phages participant au processus au sein de la bactérie, serait expliqué par le rôle de facteur limitant que jouerait cette substance bactérienne absorbante.

EXISTENCE D'UN CONSTITUANT NOUVEAU DANS LE LYSAT BACTÉRIOLOGIQUE.

Si l'on considère les courbes obtenues quatre minutes après l'infection dans les cas d'infection simple (fig. 3), et d'infection de multiplicité 5 (fig. 4), on s'aperçoit qu'elles sont beaucoup plus éloignées l'une de l'autre que le sont les courbes théoriques pour $n = 1$ et $n = 5$ (fig. 1), comme si le fait d'introduire une quantité plus grande de lysat apportait un facteur supplémentaire de résistance aux rayons ultraviolets. Ce phénomène a été confirmé dans le cas de l'infection simple en introduisant : 1^o une quantité de lysat nécessaire pour infecter une bactérie sur 5 ; 2^o une quantité dix fois moindre de lysat, qui n'infecte qu'une bactérie sur 50. Dans les deux cas, les bactéries infectées

ne contiennent qu'un phage, et devraient se comporter de la même manière. Pourtant, les phases initiales de la croissance sont très ralenties dans la suspension pauvre en lysat, mais ultérieurement, ce retard est rattrapé. Il semble que le lysat contienne, outre les phages actifs, et indépendamment d'eux, un constituant qui amorce le phénomène de croissance. Des expériences récentes non publiées de Delbrück et Bailey (1946) semblent indiquer également l'existence d'un tel constituant, lequel n'a pas encore été étudié.

CONCLUSIONS.

1^o Si l'on irradie *E. coli* souche B, infecté avec un bactériophage *T*₂, aussitôt après l'infection, on supprime le pouvoir infectieux par inactivation du phage à l'intérieur de la cellule hôte.

2^o La photo-résistance de la bactérie infectée augmente pendant la première moitié environ de la période latente. Ceci peut être dû à l'accumulation autour du phage d'une substance fortement absorbante dans l'ultraviolet. Plus tard, la résistance diminue vis-à-vis des fortes doses, tandis que se précisent les indices de multiplication. On pense que la substance absorbante serait utilisée à la formation des nouveaux phages. Une étude plus précise est entravée par la variabilité individuelle.

3^o Les lysats bactériophagiques semblent contenir, à côté des phages actifs, un autre constituant qui influence les premières phases du processus précédent.

4^o Dans le cas d'infection multiple avec le phage *T*₂, plusieurs phages peuvent pousser dans la même cellule hôte. Il n'y a pas d'exclusion en faveur d'un seul phage.

BIBLIOGRAPHIE

Travail effectué au laboratoire de génétique de la Carnegie Institution, Cold Spring Harbor, U. S. A. Un mémoire détaillé ayant paru déjà (LURIA et LATARJET, 1947), le présent exposé représente seulement un résumé dépourvu de détails expérimentaux et de discussion approfondie.

ANDERSON (T. F.). *J. Bact.*, 1944, **47**, 113.

DELBRÜCK (M.). *J. Bact.*, 1945, **50**, 131.

DELBRÜCK (M.) et LURIA (S. E.). *Arch. Biochem.*, 1942, **1**, 111.

LATARJET (R.) et WAHL (R.). *Ces Annales*, 1945, **71**, 336.

LURIA (S. E.) et LATARJET (R.). *J. Bact.*, 1947, **53**, 149. 149-163.

PIRIE (N. W.). *Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biol.*, 1946, **12** (sous presse).

ROUYER (M.) et LATARJET (R.). *Ces Annales*, 1946, **72**, 89.

WITKIN (E.). *Proc. Nat. Ac. Sc.*, 1946, **32**, 59.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e)

Séance du 9 janvier 1947.

COMMUNICATIONS (SUITE ET FIN)

ÉTUDE DE LA MALADIE EXPÉRIMENTALE D'UN LAPIN PROVOQUÉE PAR UN *CANDIDA ALBICANS* AGENT PROBABLE D'UNE MYCOSE PULMONAIRE

par GABRIEL SEGRETAIN.

Le Dr Morel, de Marseille, nous a envoyé une culture d'un crachat pour diagnostic de mycose et, à 37° sur gélose Sabouraud un seul germe s'est développé ; il s'agit d'un champignon levuriforme présentant des formes levures ovales arrondies et quelques éléments filamentueux cloisonnés souvent dissociés en courts articles rectangulaires. Quelque temps après le malade lui-même s'est présenté à notre laboratoire. Il s'agit d'un Hollandais qui, depuis dix-huit ans, fait chaque année des hémoptysies en général légères et qui a, chaque matin, une abondante expectoration. Sur un crachat du matin recueilli dans une boîte de Petri stérile, nous avons isolé le champignon. D'autre part, la recherche des bacilles de Koch dans les crachats a toujours été négative. Le Dr Schaefer, du Service de la Tuberculose à l'Institut Pasteur, a bien voulu se charger d'une nouvelle recherche des bacilles de Koch par culture sur un milieu de Löwenstein et par inoculation au cobaye ; le résultat a été négatif. Enfin le Dr Morel s'est assuré que la bouche et le pharynx du malade ne contenaient pas de mycélium.

Afin de déterminer la nature de ce champignon, nous l'avons cultivé sur différents milieux. En culture sur lame en eau de pomme de terre gélosée, nous avons obtenu à 37° une filamentation abondante avec des blastospores disposées en verticilles réguliers. A leur extrémité, certains de ces filaments se ramifient et portent des bouquets de chlamydospores terminales : ce sont de grosses cellules rondes ou légèrement ovales dont la paroi est très épaisse. D'après MM. Langeron et Guerra, ces chlamydospores sont caractéristiques du groupe *Candida* (ou *Mycotorula*) *albicans*, le parasite du muguet.

En vue d'étudier le rôle pathogène de ce champignon, nous avons inoculé, dans la veine de l'oreille d'un lapin, le produit d'une culture

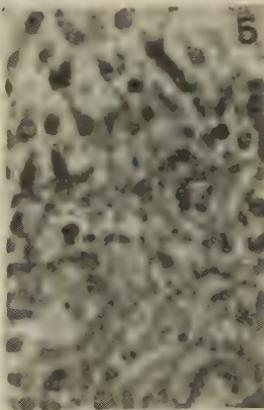
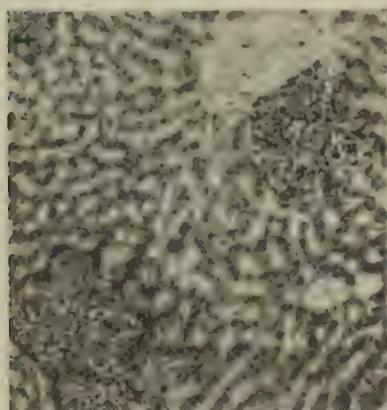
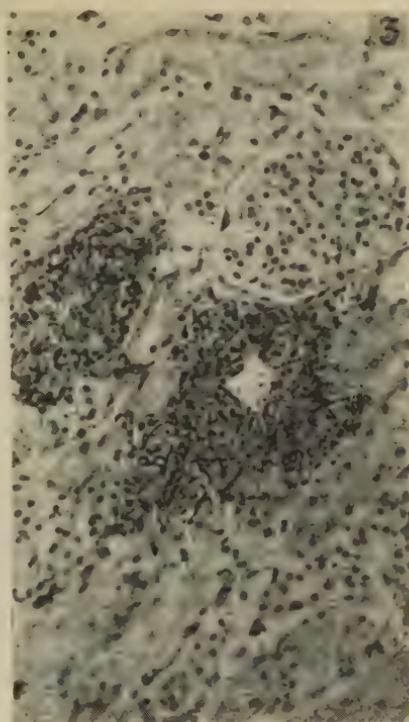
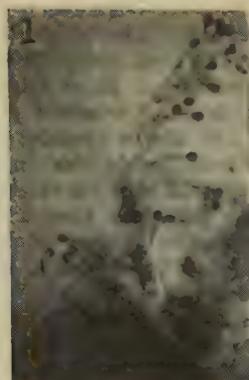


FIG. 1. — Formes filamenteuses de *Candida albicans* portant des chlamydospores terminales et quelques blastospores souvent en amas $\times 250$. (Cliché Jeantet.)
FIG. 2. — Frottis de rein montrant la forme filamenteuse du champignon dans l'organe $\times 1200$. (Cliché Jeantet.)

FIG. 3. — Coupe de rein montrant à côté de deux amas du champignon, un glomérule et des tubes peu altérés $\times 325$. (Cliché Jeantet.)

FIG. 4. — Coupe de foie. A côté des lésions, le tissu du lobule paraît intact. $\times 325$. (Cliché Jeantet.)

FIG. 5. — Parasite très grossi dans une lésion du rein. $\times 1200$. (Cliché Jeantet.)

sur gélose de Sabouraud contenant seulement des formes levures de 3 à 6 μ . L'animal est mort trois jours après ; il avait présenté dès le deuxième jour des symptômes graves, en particulier perte totale de l'appétit. A l'autopsie, les poumons injectés de sang faisaient penser que l'animal était atteint de pneumonie. Les autres organes semblaient normaux, les reins peut-être un peu gros. La culture du sang du cœur nous a redonné le champignon levuriforme avec les chlamydo-spores typiques. Une culture en bouillon ne s'est pas troublée. Un frottis fait avec un fragment de rein nous a montré l'aspect du champignon dans cet organe : forme filamenteuse à articles courts, bifurqués et à extrémités plus ou moins renflées.

Dans les poumons, il nous a été très difficile de déceler le parasite sur coupes (1), celui-ci est en effet très rare, par contre nous avons trouvé un grand nombre de polynucléaires. La partie corticale des reins est très atteinte et les glomérule intacts peu nombreux, les lésions sont rares dans le reste de l'organe. Les parasites se groupent dans le parenchyme rénal sous forme d'amas d'éléments polymorphes. Dans l'amas lui-même ou à sa périphérie, on trouve des filaments à articles terminaux renflés, en forme de massue ou de quille, et des formes rondes, parfois pourvues d'une pointe, ovales ou bourgeonnantes. La disposition de ces formes est quelconque. Le tout est rarement entouré d'éléments inflammatoires parmi lesquels prédominent les mononucléaires ; les polynucléaires sont rares. En dehors de ces nodules inflammatoires, on reconnaît la structure en général peu altérée de l'organe.

Dans le foie, de nombreuses lésions de même type se trouvent à des places quelconques dans les lobules.

Dans la rate, le champignon est difficile à déceler dans les lésions par suite d'une profonde altération des filaments, mais ici les parasites se trouvent dans une gangue plus ou moins délimitée qui se colore en orange par l'éosine orange et dont l'origine est douteuse. Peut-être s'agit-il d'un produit élaboré par le champignon.

Dans tous ces organes, mais particulièrement dans les poumons, on a trouvé d'abondants dépôts de fibrine dans les vaisseaux. Probablement à cause de la rapidité de la maladie expérimentale, nous n'avons pas trouvé d'éosinophiles assez fréquents dans les cas de mycoses.

Dans un cas de mycose pulmonaire à *Candida albicans*, M. Magrou, après inoculation du parasite au lapin, a trouvé dans les reins des grains mycosiques enfermés dans une gangue hyaline, bien délimitée et présentant à la périphérie des massues échinulées ou barbelées ; il a comparé ces formations aux grains de l'actinomycose et de certaines staphylococcies expérimentales (botryomycose). Ces grains étaient entourés de nombreux polynucléaires. Nous n'avons pas retrouvé ces formations dans nos préparations.

Par les dernières nouvelles que nous avons eues du malade soigné en Hollande, nous avons appris qu'il supportait difficilement le traitement par les iodures.

(1) Je remercie M^{me} KVIATKOVSKY pour l'aide précieuse qu'elle a bien voulu m'apporter pour effectuer diverses colorations de coupes, qui furent nécessaires pour bien comprendre la nature des lésions.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.

Le mode d'action des endotoxines bactériennes. — I. Introduction à une étude générale, par A. DELAUNAY et J. LEBRUN. — II. Les troubles circulatoires chez les animaux intoxiqués par une endotoxine, par A. DELAUNAY, J. LEBRUN et H. COTTEREAU.

Contribution à l'étude de la morphologie du bacille de Hansen, par R. CHAUSSINAND.

Sur l'utilisation du glucose par le vibron cholérique en anaérobiose forcée, par J. GALLUT.

Etude sur le polyoside O du bacille typhique et préparation d'un sérum de lapin spécifique de ce polyoside, par P. GRABAR et J. OUDIN.

Diagnostic biologique des infections à *Salmonella*. — IV. Technique de préparation des suspensions de bacilles d'Eberth pour la recherche des agglutinines Vi, par M^{me} J. GRABAR.

A propos des essais de culture du bacille de la lèpre, par R. CHAUSSINAND.

Séance du 6 février 1947.

Présidence de M. MAGROU.

COMMUNICATIONS

INOCULATION DE LA LÉPRE AUX ANIMAUX

par M. CHAUSSINAND.

Depuis 1936, nous avons effectué de nombreux essais d'inoculation du germe de la lèpre sur divers animaux. Voici un résumé des observations les plus intéressantes :

Inoculation de la lèpre à la souris blanche. — Chez ces animaux, nous n'avons utilisé comme matière d'inoculation que des suspensions de lépromes broyés dans de l'eau physiologique, filtrées sur gaze. Les doses injectées variaient d'environ 0,1 g. à 0,25 g. de lépromes dans 0,2 à 0,5 cm³ de liquide. Seules, les voies sous-cutanée et intrapéritonéale ont été employées.

Les souris inoculées par voie intrapéritonéale ont toutes succombé au bout de quelques jours. Des bacilles acido-résistants ont pu être retrouvés en petit nombre dans le foie, la rate et dans les reins.

Les injections sous-cutanées ont donné de meilleurs résultats :

Dix souris blanches sont inoculées à l'abdomen, le 18 avril 1940, par une injection sous-cutanée de 0,25 g. de léprome broyé dans 0,5 cm³ d'eau physiologique. Sept succombent, plus ou moins rapidement, à la suite d'infections intercurrentes. Les trois souris résistantes meurent dix, quatorze et quinze mois après l'injection. A l'autopsie, on observe, au lieu d'inoculation, une infiltration fortement vascularisée du tissu sous-cutané. L'examen de ces lésions montre la présence de très nombreux bacilles acido-résistants ayant l'aspect de germes provenant d'un léprome en activité. On trouve également de nombreux bacilles dans les ganglions lymphatiques inguinaux et de rares bacilles dans les poumons, le foie et la rate. Les essais de culture et l'inoculation au cobaye s'étant révélés négatifs, la possibilité d'une infection due au bacille de Koch ou à des bacilles paratuberculeux a pu être éliminée. A noter que ces animaux présentaient une alopecie totale trois à quatre mois avant leur mort.

Les passages sont pratiqués par voie sous-cutanée sur 4 souris qui succombent un à deux mois après l'inoculation. Les lésions locales observées sont minimes et on ne retrouve de rares bacilles acido-résistants qu'au lieu d'injection et dans les ganglions lymphatiques régionaux.

Ces expériences n'ont pu être poursuivies, l'Institut Pasteur de Saïgon ayant perdu son élevage de souris blanches à la suite d'épidémies.

Inoculation de la lèpre au singe. — Nos premiers essais datent de 1936 (1), mais nous n'avons réussi à infecter le singe (*Macacus cynomolgus*) qu'en 1943 (2).

Au début, nous inoculions, soit du suc de lépromes, soit des suspensions de lépromes broyés, filtrées ou non filtrées, par les voies digestive, intradermique, intramusculaire, intrapéritonéale, intraveineuse, intrarachidienne, intratesticulaire, sous-cutanée et dans la chambre antérieure de l'œil.

Seules, les inoculations intradermiques et sous-cutanées ont permis de constater des altérations locales appréciables. Dans ces cas, on observait, trois à cinq semaines après l'inoculation, la formation d'un nodule qui persistait quatre à huit semaines et disparaissait finalement sans laisser de traces. Cependant, cette lésion locale ne pouvait être considérée comme une véritable infection puisque les bacilles injectés dégénéraient et étaient éliminés ou détruits en relativement peu de temps. Jamais une multiplication des germes n'a pu être notée. Même les inoculations répétées ne provoquaient pas d'infections. En effet, les altérations locales se formaient et disparaissaient de plus en plus rapidement et, vers la quatorzième injection, plus aucune lésion ne pouvait être obtenue malgré l'inoculation de doses très fortes.

L'infection du singe par implantation de nodules lépromateux dans le tissu sous-cutané n'a pas réussi, les nodules, continuellement déplacés

(1) R. CHAUSSINAND, *Intern. J. Leprosy*, 1941, 9, 203.

(2) R. CHAUSSINAND, *Rev. méd. franç. E. O.*, 1943, 21, 627.

par les mouvements de l'animal, n'ayant pu se fixer convenablement. Chez 2 macaques, nous avions pourtant observé, un à deux mois après l'inoculation, l'apparition de lésions purulentes bacillifères de la peau, situées au niveau de l'emplacement du léprome et qui se sont cicatrisées quelques semaines plus tard. Nous estimons que ces altérations cutanées bacillifères ne représentaient pas de véritables lésions d'infection, mais plutôt des altérations dues à l'élimination d'un corps étranger, puisque les bacilles étaient en grande partie dégénérés et que la réaction de Mitsuda (3) s'est toujours montrée négative chez ces animaux. En effet, la simple « présence » de bacilles de Hansen dans l'organisme du singe ne détermine jamais le virage de la réaction de Mitsuda.

Par contre, l'insertion d'un léprome dans la cavité péritonéale nous a permis de réaliser l'infection lépreuse chez le singe.

Le 7 janvier 1943, un nodule sous-cutané provenant d'un lépromateux non traité est fixé dans le mésocolon transverse d'un *Macacus cynomolgus*. Les suites opératoires sont normales. L'alimentation de cet animal comporte une grande proportion de taro (*Colocasia*) légèrement cuit (4).

Le 29 juin 1943, on observe l'apparition de quatre lésions cutanées ulcérées de 1 cm. à 2,5 cm. de diamètre, situées à droite de l'ombilic, c'est-à-dire à distance de la cicatrice opératoire. Le singe ne montre aucun signe d'éventration. La recherche du bacille de Hansen dans la muqueuse pituitaire est négative, mais de très nombreux bacilles acidorésistants homogènes sont trouvés au niveau des lésions. Ces germes présentent toutes les caractéristiques morphologiques et de groupement reconnues aux bacilles de Hansen. Les essais de culture et l'inoculation au cobaye sont négatifs. Le singe ne réagit pas à 1 cg. de tuberculine brute intradermique. L'éventualité d'une infection due au bacille de Koch ou à des bacilles paratuberculeux est ainsi exclue.

Le 2 juillet 1943, l'animal réagit fortement à la réaction de Mitsuda (+ +). Il s'agit donc bien d'une infection lépreuse puisque le singe normal se montre insensible à cette réaction. Le singe reste en bonne santé et on note par la suite une régression des lésions cutanées accompagnée d'une disparition progressive des bacilles.

Le 20 juillet 1944, le macaque présente au niveau des anciennes lésions bacillifères des taches plates de couleur saumonée à examens bactériologiques négatifs. Une deuxième épreuve de Mitsuda pratiquée à cette date montre que la réaction a augmenté d'intensité (+ + +). On peut donc admettre que l'infection lépreuse se maintient encore, plus de dix-huit mois après l'inoculation.

Le 4 avril 1945, les lésions cutanées ont disparu et la réaction de Mitsuda se révèle négative. L'animal est abattu le 5 mai. Les examens microscopiques ne montrent aucune trace d'infection.

Nous avons pu noter des observations semblables chez deux *Macacus cynomolgus*, inoculés selon le même procédé, mais alimentés d'une façon normale.

Inoculation de la lèpre au cobaye. — Tous les essais d'inoculation de lépromes broyés (jusqu'à 0,5 g. par cobaye), effectués par des injections

(3) F. HAYASHI, *Intern. J. Leprosy*, 1933, 4, 31.

(4) M. OBERDOERFER et E. GEHR, *Zeitschr. Hyg.*, 1940, 122, 472.

intradermique, sous-cutanée, intramusculaire et intrapéritonéale n'ont donné aucun résultat. Les bacilles inoculés sont éliminés plus ou moins rapidement. Les cobayes abattus quelques semaines après l'injection présentent, en général, de rares bacilles au point d'inoculation, dans les ganglions lymphatiques, dans le foie et dans la rate. Mais, au bout de six à dix-huit mois, on ne trouve, ni lésions locales, ni bacilles acido-résistants. Jamais une multiplication des germes n'a pu être constatée.

Quatre cobayes, préalablement exposés aux rayons X jusqu'à l'apparition d'un érythème, ont été inoculés par voie intradermique. Nous n'avons pas pu obtenir de lésions cutanées bacillifères par ce procédé. Aucun germe acido-résistant n'a été décelé chez ces animaux six mois et deux ans après l'inoculation.

Par contre, l'insertion d'un nodule lépromateux sous la peau du cobaye provoque une infection spécifique localisée à condition que le léprome implanté ne soit pas déplacé par les mouvements de l'animal et puisse ainsi se greffer dans le tissu sous-cutané. Le lieu d'insertion qui nous paraît le plus favorable est la région de la nuque. Dans ces cas, on note déjà chez les animaux, abattus environ quatre mois après l'intervention, que le nodule lépromateux s'est greffé dans le tissu sous-cutané. En effet, le léprome est enveloppé intimement de tissu cellulaire néoformé et une vascularisation intense démontre qu'il se trouve en rapport de nutrition avec l'organisme. On constate dans le nodule même une très forte multiplication des germes. Le centre présente d'ordinaire un aspect caséux, mais l'examen microscopique montre que le magma prélevé se compose, pour ainsi dire uniquement, de bacilles homogènes, non granuleux, au point que le frotti semble provenir d'une culture pure de bacilles acido-résistants. De nombreux bacilles, non dégénérés, s'observent également dans tout le tissu sous-cutané des régions de la nuque et du haut du dos ainsi que dans les ganglions lymphatiques régionaux. Les organes internes sont, en général, indemnes de germes. Les essais de cultures sont négatifs. Cette infection lépreuse localisée se révèle chez le cobaye vivant par le virage de la réaction de Mitsuda. Par contre, quand l'inoculation de bacilles de Hansen n'a pas déterminé l'infection, la réaction de Mitsuda reste négative.

En employant cette méthode d'inoculation, nous avons même réussi à transmettre l'infection lépreuse d'un cobaye infecté à des cobayes sains :

Le 13 août 1943, on insère dans le tissu sous-cutané de la nuque d'un cobaye adulte un fragment de léprome de la dimension d'un grain de maïs, provenant de l'oreille d'un lépromateux non traité (Bacilles de Hansen : + + +). L'animal est insensible à la réaction de Mitsuda.

Le 25 novembre 1943, on observe l'apparition d'une lésion cutanée saillante érythémateuse à l'abdomen. Les examens bactériologiques de la muqueuse pituitaire et de deux biopsies prélevées sur la lésion suspecte sont négatifs. L'animal est insensible à 1 cg. de tuberculine brute intradermique, mais la réaction de Mitsuda se montre fortement positive (+ +).

L'animal meurt galeux le 28 février 1944. On constate à l'autopsie que le nodule s'est greffé dans l'organisme du cobaye. On note également une infection localisée du tissu sous-cutané dans les régions de

la nuque et du haut du dos. Le centre du nodule est ponctionné et contient une véritable purée de bacilles homogènes acido-résistants (Culture : négative). Le tissu sous-cutané infecté présente de nombreux bacilles homogènes, bien colorables par le Ziehl, ayant l'aspect de germes provenant d'un lépreux en activité. Rares bacilles dans les ganglions régionaux. Pas de germes vus dans le mucus nasal, dans la lésion abdominale ni dans les organes internes.

Une heure après l'autopsie, le nodule entouré du tissu sous-cutané infecté est implanté sous la peau de la nuque d'un jeune cobaye. Une réaction de Mitsuda, pratiquée le 1^{er} juin 1944, se révèle fortement positive (+ +), tandis que la réaction de Mantoux (1 cg. de tuberculine brute) est négative.

L'animal est abattu le 2 août 1944. Le tissu sous-cutané infecté est implanté sous la peau de la nuque d'un jeune cobaye. La réaction de Mitsuda, pratiquée le 3 décembre 1944, n'est que très faiblement positive. Une deuxième réaction de Mitsuda, effectuée le 4 avril 1945, se révèle négative. L'animal est abattu le 5 mai. Aucune trace d'infection n'a pu être décelée.

En employant le procédé que nous venons de décrire nous avons réussi à transmettre l'infection lépreuse à 10 cobayes.

*
* *

Il ressort de ce qui précède que nous avons réussi la transmission de la lépre humaine au singe, au cobaye et vraisemblablement à la souris blanche. Le mode d'inoculation qui semble donner les meilleurs résultats est celui de la greffe d'un lépreux dans l'organisme animal. Pour cela les nodules sous-cutanés, non adhérents à la peau, provenant de lépromateux non traités sont à utiliser de préférence. En effet, ces nodules peuvent être énucléés aseptiquement chez le malade sans aucune difficulté et il est probable que leur coque fibreuse intacte les préserve d'une résorption rapide par lyse ou par digestion dans les tissus de l'animal inoculé. Le seul inconvénient réside dans la rareté relative de ces nodules sous-cutanés. Nous ne pensons pas que la splénectomie ou une alimentation riche en sapotoxines (taro) favorise l'infection lépreuse puisque nous avons obtenu des résultats positifs sans employer ces procédés.

Nous basant sur nos observations concernant le singe et le cobaye, nous estimons que l'infection lépreuse ne peut être considérée comme acquise chez ces animaux que s'ils réagissent nettement à l'épreuve de Mitsuda trois à quatre mois après l'inoculation, tout en restant insensibles à 1 cg. de tuberculine brute intradermique. A l'autopsie, la multiplication des germes doit être évidente et l'éventualité d'une infection à bacilles de Koch ou à bacilles paratuberculeux doit être éliminée par des essais de culture et par l'inoculation au cobaye. Nous ne saurions trop recommander la prudence dans l'interprétation des observations microscopiques. La présence de bacilles acido-résistants dans des organes internes et même dans des lésions cutanées ne permet pas toujours de conclure à une réussite de l'infection, puisqu'il s'agit très souvent de bacilles dégénérés en voie d'élimination. D'autre part, dans les lésions dues à des infections à bacilles paratuberculeux, on trouve

fréquemment des macrophages bourrés de germes qui peuvent facilement être confondus avec des « cellules lépreuses ».

A notre avis, il est illusoire d'espérer que des essais thérapeutiques pourraient être entrepris sur des animaux inoculés de lèpre. Il est très peu probable qu'une infection lépreuse transmissible, à évolution de plus en plus grave, puisse être réalisée par passages sur des animaux. On réussira par des artifices de laboratoire à infecter des animaux et cette infection persistera plus ou moins longtemps, mais, vraisemblablement, on n'arrivera jamais à déterminer une véritable « maladie » comparable à l'infection lépreuse de l'homme.

(*Institut Pasteur. Service de la lèpre.*)

LA TRANSMISSION EN SÉRIE DE LA LÈPRE HUMAINE AUX ANIMAUX N'EST PAS RÉALISABLE PAR LE PROCÉDÉ D'OTA

par M. CHAUSSINAND.

Ota et Sato avaient déjà rapporté, au Congrès du Caire, leurs premières expériences sur la poule. Ils ont ensuite traité ce sujet dans plusieurs communications (1). En 1941, Ota fut chargé, par le gouvernement japonais, de faire des conférences en Indochine sur sa récente découverte, publiée au Japon, concernant l'inoculation en série de la lèpre humaine aux animaux.

Ota inocule au coq, dans le muscle petit pectoral droit, la *mixture infectante* suivante :

Suspension de 0,5 g. de lépromes broyés dans de l'eau physiologique	5 g.
Poudre de terre d'infusoires	0,05 g.
Bleu de Trypan.	0,05 g.
Iodure de potassium	0,05 g.

Dans le muscle petit pectoral opposé, il injecte la même mixture, mais dépourvue de matériel lépreux (*mixture excitante*). Les coqs ainsi traités sont abattus entre deux semaines et dix-sept mois. Chez tous les animaux, on trouve au niveau de l'inoculation infectante des granulomes lépreux contenant de nombreux bacilles acido-résistants et des cellules vasculaires ayant l'aspect de « cellules lépreuses ». Ces granulomes inoculés à des poules, selon la technique sus-indiquée, reproduisent exactement les mêmes lésions. Ota a ainsi réussi neuf passages et note chez tous les animaux, sans aucune exception, des altérations pathologiques identiques et la présence de nombreux bacilles acido-résistants. Le cobaye, le rat blanc et la souris blanche s'infectent de la même manière, si on les inocule avec des granulomes prélevés sur le coq. La transmission

(1) M. Ota et S. Sato, *Int. J. Leprosy*, 1938, 6, 467 et 1940, 8, 81.

de la lèpre au cobaye s'effectue aussi directement en injectant du matériel lépreux humain dans les muscles de la région lombaire, mais les doses des mixtures infectante et excitante doivent être limitées à 2 cm³ chacune. Les passages en série réussissent également chez les cobayes. Ota formule les conclusions suivantes : « Nous sommes maintenant convaincu que la transmission en série de la lèpre humaine à l'animal a été vraiment réalisée et qu'un des obstacles principaux qui entravent les recherches étiologiques et thérapeutiques de la lèpre a disparu. »

Dès 1941, nous avons répété les expériences d'Ota sur des coqs, des poules, des cobayes, des rats blancs et des souris blanches en suivant strictement la technique recommandée par l'auteur. Ce travail de contrôle n'a été terminé qu'en 1944. En voici les points les plus marquants :

Selon Ota, l'infection peut se constater, sans exception, de deux semaines à dix-sept mois après l'inoculation. Or, nous estimons que deux semaines représentent un laps de temps trop court pour permettre au bacille de Hansen de se fixer dans l'organisme du coq et un contrôle pratiqué au bout de dix-sept mois nous aurait demandé près de trois ans pour effectuer un seul passage. Aussi avons-nous décidé d'abattre les animaux quatre, cinq, six et huit mois après l'inoculation. Les résultats observés furent les suivants :

Tous les animaux abattus ont présenté au point d'inoculation des taches plus ou moins importantes de couleur orangée, mais le nombre des bacilles acido-résistants rencontrés dans ces taches s'est révélé bien plus faible que celui des germes injectés. En général, les bacilles de Hansen étaient très rares et en partie dégénérés. Deux coqs ont fait exception : l'un (n° 11) montrait dans les frottis, cinq mois après l'inoculation, encore 40 bacilles en moyenne par champ microscopique examiné, tandis que chez l'autre (n° 14), aucun bacille n'a pu être trouvé quatre mois après l'inoculation. Nous n'avons donc pas observé une multiplication du germe de la lèpre dans l'organisme du coq. En outre, les organes internes ont toujours été indemnes d'altérations pathologiques et de bacilles.

Les lésions de ces coqs furent prélevées et inoculées à des poules. Les recherches du bacille de Hansen effectuées chez ces animaux trois, cinq et six mois plus tard ont été négatives. Même la poule injectée avec les lésions du coq n° 11, qui contenait de nombreux germes, s'est montrée négative au bout de trois mois.

Les passages pratiqués sur cobaye, rat blanc et souris blanche se sont également révélés négatifs après une incubation de deux et de quatre mois.

Nous avons aussi injecté des lépromes directement, d'après la méthode d'Ota, à des cobayes, des rats blancs et à des souris blanches. Ces animaux, abattus au bout de deux, trois et sept mois, n'ont présenté aucun germe acido-résistant aux points d'inoculation.

On peut admettre que l'injection simultanée de terre d'infusoires et de bacilles retarde l'élimination normale de ces derniers et leur permet de se maintenir plus longtemps dans le tissu musculaire. Il est donc fort probable que, si les passages avaient été pratiqués déjà au bout de deux semaines, les bacilles de Hansen auraient pu être transportés suc-

cessivement sur plusieurs animaux. Cependant, un transfert mécanique de bacilles de Hansen, effectué rapidement d'un animal à l'autre, ne prouve nullement la réussite de la transmission de l'infection lépreuse. L'observation suivante le démontre :

Nous avons exactement répété l'expérience d'Ota, mais en remplaçant les bacilles vivants par des bacilles de Hansen soumis à l'ébullition pendant une heure. En pratiquant les « passages » toutes les deux semaines, nous avons pu reproduire successivement, sur trois animaux, les lésions bacillifères décrites par Ota. Nous avons même noté la présence de rares germes acido-résistants dans le foie de l'animal injecté en premier lieu. L'expérience a été arrêtée volontairement après le troisième « passage ».

Nos conclusions sont formelles : là transmission en série de la lépre humaine aux animaux n'est pas réalisable par le procédé d'Ota. Le résultat obtenu n'est pas une infection lépreuse transmissible aux animaux en série, comme le prétend cet auteur. Il s'agit simplement d'un transfert mécanique de bacilles de Hansen, morts ou vivants, d'animal à animal.

(Institut Pasteur. Service de la lépre.)

PERSISTANCE DES CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES ET BIOLOGIQUES DES BACILLES DE KOCH DANS LES PRODUITS EXPÉDIÉS AU LABORATOIRE

par F. TISON.

Depuis les travaux de Robert Koch (1), les hygiénistes se sont préoccupés des conditions de survie des bacilles tuberculeux dans les produits pathologiques. Si d'intéressantes recherches ont été faites au point de vue épidémiologique, nous avons voulu, de notre côté, poursuivre cette étude au sens de la pratique pure en laboratoire.

Que deviennent les bacilles de Koch aux points de vue : morphologique, tinctorial et vital dans les diverses conditions d'expédition au laboratoire d'analyses ?

I. CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES ET TINCTORIAUX. — Arloing (2) avait déjà signalé le polymorphisme acquis du bacille tuberculeux dans les conditions anormales de survie.

Dans notre première expérience, portant sur onze crachats positifs recueillis directement ou par tubage gastrique, nous avons examiné, dix-cinq jours en dix-cinq jours, les caractères des bacilles colorés par la méthode de Ziehl. Les produits pathologiques étaient conservés à l'obscurité dans des flacons bouchés au caoutchouc utilisés couramment pour l'expédition :

(1) Congrès international de Berlin, 1890.

(2) C. R. Acad. Sci., 1908, 146, 100.

a) *A une température de + 7°.* — Comme le laissaient prévoir les travaux de Chrétien (3), les bacilles ne sont aucunement modifiés même après trois mois. Les germes banaux eux-mêmes et les cellules sont à peine altérés.

b) *A une température de + 22°.* — On constate une lyse assez lente du crachat, mais persistance des bacilles de Koch, non modifiés après trois mois.

c) *A une température de + 37°.* — Une fluidification rapide, accompagnée de la prolifération des anaérobies, n'altère en rien les caractères distinctifs du bacille de Koch.

II. SURVIE DU BACILLE DE KOCH. — a) *Crachats recueillis directement.* — Une partie des produits conservés dans les mêmes conditions que ci-dessus a été inoculée au cobaye et cultivée sur milieu de Löwenstein, de jour en jour jusqu'au dixième jour, et de dix jours en dix jours jusqu'au troisième mois.

Les crachats conservés à + 7° et à + 22° restent virulents jusqu'au delà du troisième mois.

Par contre, à + 37° aucun des crachats n'a conservé sa végétabilité ou sa virulence au delà du quatrième jour. A partir du cinquième jour, les produits ne sont plus pathogènes pour le cobaye. Celui-ci présente une légère allergie transitoire due au bacille mort, mais ne décèle aucune lésion bacillaire lors de l'autopsie pratiquée au troisième mois.

En 1912, Galtier, Cadéac, Malet et Moussu (4) avaient étudié l'effet sur les bacilles tuberculeux de la putréfaction des cadavres. Si, dans ce cas, les bacilles survivent longtemps, il n'en est pas de même dans les milieux de culture riches en anaérobies protéolytiques, où la virulence disparaît en quelques heures (Passini) (5).

Dans notre cas particulier, on pouvait se demander s'il s'agissait de l'action des ferment, de la protéolyse par les anaérobies ou du phénomène relaté par Buc (6).

Après quelques jours de séjour à l'étuve, en vase clos, les crachats ensemençés sur milieux usuels ne donnent naissance à aucune colonie : tous les germes aérobies banaux sont morts. Mais une assez forte quantité du même produit n'entrave en aucune façon la culture des différents germes d'apport extérieur et en particulier du pneumocoque sur le bouillon nutritif. Ceci élimine la probabilité de présence de substances bactériicides.

L'ensemencement sur gélose de Veillon d'une goutte de crachat lysé donne, par contre, une abondante pullulation de germes anaérobies avec dégagement gazeux. Il s'agit d'une « lutte pour la vie » avec victoire des anaérobies qui trouvent dans un flacon clos à 37° les conditions optimales de développement.

Il suffit d'ajouter à 1 cm³ de crachat neutralisé une goutte de solution de pénicilline à 5.000 U. O. par centimètre cube pour entraver tout développement de germes aérobies ou anaérobies. Dans ces conditions, l'inocu-

(3) *Soc. cent. Méd. vétér.*, 1921, **74**, 270.

(4) Compte rendu de la Caisse nationale des recherches scientifiques, 1912.

(5) *Wien. Klin. Wochenschr.*, 1925, **38**, 1182.

(6) *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **109**, 433.

culation ou la culture du mélange, même après dix jours de séjour à l'étuve, se révèle *toujours positive*.

b) *Crachats recueillis par tubage gastrique*. — L'expérience ne pouvait ici être valable que dans les conditions habituelles d'indication du tubage gastrique, c'est-à-dire avec très peu de bacilles. C'est pourquoi les essais ne portent que sur sept tubages et n'ont été effectués que suivant les normes les plus courantes, c'est-à-dire à la température moyenne de 22° environ. Le produit de lavage gastrique recueilli par tube de Fauchet est conservé dans un flacon.

La surinfection banale est ici peu importante, même après plusieurs jours, mais l'action du suc gastrique, de l'acide chlorhydrique et parfois de la bile était à craindre. En fait, les inoculations pratiquées de jour en jour deviennent généralement négatives aux environs du dixième jour. Il ne semble pas y avoir d'inconvénient à attendre deux ou trois jours les résultats de l'examen direct ou de l'homogénéisation d'une partie du produit recueilli qui, s'il était positif, rendrait inutile le diagnostic biologique.

III. APPLICATION DE CES CONSTATATIONS AU DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA TUBERCULOSE. — a) *Cultures*. — En ce qui concerne le crachat recueilli directement, nous avons insisté récemment (7) sur l'intérêt de l'ensemencement du produit simplement neutralisé, mais non modifié, en présence de pénicilline. Il n'y a donc aucun inconvénient à préparer ainsi le crachat avant expédition au laboratoire.

b) *Inoculation au cobaye*. — Des travaux récents de MM. P. Hauduroy, G. Bouvier et W. Rosset (8) et de nous-même (9) ont montré tout l'avantage qu'on pouvait tirer de l'inoculation du produit non modifié chez le cobaye mis à l'abri de toute infection banale par le traitement sulfamidé. Le remplacement des sulfamides par la pénicilline nécessite, nous l'avons constaté, des injections répétées à petit intervalle et prolongées assez loin pour prévenir des accidents qui ne surviennent jamais avant le quatrième jour. Mais nous avons pu obtenir un résultat excellent en préparant le crachat ou le culot de centrifugation de tubage de la façon suivante :

Après neutralisation soigneuse en présence de tournesol, un séjour d'une demi-journée à l'étuve au contact de pénicilline a pour but d'éliminer tous les germes banaux. Des ensemencements ultérieurs sur bouillon en font la preuve (7).

Le cobaye inoculé avec ce mélange ne fait aucune réaction locale ou générale.

CONCLUSIONS. — L'expédition au laboratoire des produits pathologiques dans le but de rechercher les bacilles acido-résistants par l'examen microscopique ne demande aucune précaution spéciale.

L'expédition des mêmes produits, dans le but d'un diagnostic biologique, doit se faire à pH neutre en présence de pénicilline. Ceci est particulièrement important dans les pays chauds où, pendant un

(7) *Ces Annales*, 1947, **73**, 186.

(8) *Presse méd.*, 16 novembre 1946, p. 770.

(9) *Ces Annales*, 1947, **73**, 186.

long trajet, la pullulation des anaérobies peut tuer les bacilles de Koch.

L'inoculation au cobaye peut se faire sans risque d'infection banale après un séjour de quelques heures à l'étuve du produit neutralisé en présence de pénicilline.

(*Travail du Laboratoire central des Villages Sanatoriums de haute altitude à Praz-Coutant [Médecin-Directeur : P.-E. Davy].*)

ETUDE D'UNE BACTERIE ANAEROBIE NOUVELLE DE GUINÉE FRANÇAISE *CILLOBACTERIUM COMBESI* n. sp.

par A. R. PRÉVOT et J. LAPLANCHE.

Au cours d'une prospection bactériologique des sols de l'A.O.F., nous avons prélevé un échantillon de terre dans la grande forêt primaire de Guinée française, dans les environs de N'Zo, avant d'arriver dans la région du Nimba. Nous y avons isolé, en dehors de nombreux aérobies du groupe *B. subtilis*, une souche d'*Eubacterium fœdans* et une nouvelle espèce anaérobie dont voici la description :

Morphologie : Bâtonnets droits à extrémités carrées, longs de 3 μ à 4,2 μ sur 0,7 μ ; rarement isolés ou en paires, souvent en chaînettes de 3 à 10 éléments; mobiles par ondulations lentes; Gram-positifs, non sporulés.

Physiologie : Anaérobie strict; poussant bien à 37°, moins bien à 26°; thermorésistance nulle. Pouvoir réducteur élevé (réduit rouge neutre et safranine). Longévité supérieure à deux mois.

Cultures : Gazogènes et fétides. En gélose profonde, colonies irrégulières ouatées ou arborescentes, dégagement gazeux; en eau peptonée, trouble discret; en bouillon glucosé, trouble abondant avec dépôt d'une phytoglée visqueuse et dégagement gazeux fétide; la gélatine est liquéfiée en cinq jours; le lait est d'abord coagulé en huit jours, puis complètement digéré. Les protéines coagulées ne sont pas attaquées. Les glucides ne sont pas fermentés, fait constaté par l'absence de fermentation acide et par l'analyse pondérale (méthode de G. Bertrand). Les nitrates ne sont pas réduits en nitrites.

Caractères biochimiques : La fermentation du bouillon VF glucosé à 1 p. 100 produit SH₂, NH₃ (0,07 g. p. 100 cm³), des alcools, des traces d'acétyl-méthyl-carbinol, une acidité volatile élevée (0,32 g. p. 100 cm³) consistant en un mélange d'acides formique, butyrique et valérianique (formique : valérianique = 2 p. 1, d'après les courbes de Duclaux et confirmé par les micro-cristallisations de formiate de cérium et de valérianate de zinc; et butyrique en quantité assez importante pour donner des microcristaux de butyrate d'argent). Il n'y a pas de formation d'acide lactique. Nous soulignons le fait, en apparence paradoxal, de l'absence d'attaque des glucides et de la production élevée d'acides volatils due uniquement à la fermentation des peptides et acides aminés du bouillon VF. Il s'agit d'ailleurs là d'un nouveau type fermentaire non encore rencontré.

Pouvoir pathogène : Nul pour le cobaye. Pas de toxine. Les cultures de vingt-quatre heures centrifugées se montrent fortement hémolytiques pour les hémiasies de mouton : $0,01 \text{ cm}^3$ hémolyse $0,5 \text{ cm}^2$ de la suspension de globules dilués à 5 p. 100 très rapidement.

Position dans la systématique : Bâtonnet mobile Gram-positif et asporulé, ce germe appartient au genre *Cillobacterium* Prévot (1). Au sein de ce genre, il doit être comparé aux espèces gazogènes protéolytiques actuellement au nombre de 2 : *Cillobacterium spatuliforme* (Distaso) P. et *Cillobacterium multiforme* (Distaso) P. Le premier se distingue de notre souche en ce qu'il est glucidolytique et indologène et qu'une de ses extrémités est souvent élargie en spatule ; le second se distingue par ses colonies lenticulaires, la fermentation des glucides la formation d'indol, la digestion du blanc d'œuf ; ni l'un ni l'autre ne sont fétides. Notre souche répond donc bien à une espèce nouvelle pour laquelle nous proposons le nom de *Cillobacterium combes* n. sp. (2).

(Institut Pasteur et Institut intercolonial d'Adiopodoumé.)

**EFFET COMPARATIF EN MILLIEU ALCALIN
DU FER BIVALENT ET DU FER TRIVALENT
SUR L'ACTIVITÉ
D'UN EXTRAIT PHOSPHOMONOESTERASIQUE
PROVENANT D'UN EPITHELIOMA DE L'UTERUS DU RAT
(SOUCHE T 8 DE GUERIN)**

par A. MOREL, A. JOSSERAND, J. ENSELME et P. CHENEVON.

On sait qu'un certain nombre d'auteurs ont étudié l'action des sels de fer sur diverses phosphatases. Cette question n'a pas encore été examinée pour les phosphatases contenues dans le tissu cancéreux, à notre connaissance tout au moins.

Comme matériel de recherches, nous nous sommes adressés à la souche T 8 de Guérin (épithélioma de l'utérus du rat), que ce cancérologue nous avait très aimablement procurée. Nous avons traité ces tumeurs ainsi :

Immédiatement après leur prélèvement, les tumeurs sont débarrassées des particules adipeuses adhérentes, coupées en lanières et lavées dans

(1) A.-R. PRÉVOT, *Manuel de Classification des Anaérobies*, Masson édit., 1940, 77.

(2) Dédicée au Professeur COMBES, Directeur de l'Office de la Recherche Scientifique Coloniale, dont l'aide nous a permis de réaliser l'étude bactériologique des sols tropicaux.

une solution stérile de ClNa à 8 p. 1.000. Puis elles sont broyées, triturées au mortier avec 1/3 de leur poids de sable fin stérile et soumises à une autolyse de quinze jours à la température ordinaire, dans 5 parties d'eau bidistillée chloroformée.

L'autolysat visqueux et légèrement brunâtre est passé sur un linge fin, puis filtré sur coton.

Nous utilisons directement cet autolysat comme source d'enzyme désirant, dans ce premier travail, observer la réaction des phosphatasées lorsqu'elles restent soumises aux influences du milieu cellulaire.

L'optimum d'activité correspond, dans notre expérience, à un pH voisin de 9.

Nous opérons sur du β -glycérophosphate de soude en laissant agir la phosphatase vingt-quatre heures à l'étuve à 37°.

Le phosphate anorganique libéré est dosé par la méthode colorimétrique de Briggs.

Nous avons recherché quelle peut être :

1° L'action du fer ionisé, sous forme de sulfate ferreux cristallisé avec 7 molécules d'eau, $\text{SO}_4\text{Fe}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et sous forme de sulfate ferrique (SO_4)²⁻ Fe_2 .

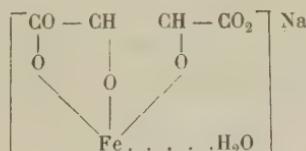
2° L'action du fer dissimulé à l'état de complexe, soit ferrico-magnésien dérivé de l'acide déhydro-ascorbique délactonisé, soit ferrico-sodique dérivé de l'acide tartrique.

Le sel complexe ferrico-magnésien de l'acide déhydro-ascorbique contient pour 100 parties en poids, 80 à 85 parties de :

$(\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_{20}\text{Fe}_2^{\text{III}} \text{Mg})$ unies à 20-25 parties $(\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_{18}\text{Fe}_2^{\text{II}})$.

Il est préparé en ajoutant une quantité suffisante d'hydrocarbonate de magnésie au mélange équimoléculaire du premier produit d'oxydation réversible de l'acide déhydro-ascorbique et de chlorure ferrique, puis en précipitant après filtration par de l'alcool fort et en désséchant rapidement dans le vide.

Le sel monosodique de l'autre complexe ferritartrique est hydraté et amorphe, à l'état cristallisable, il a, d'après Franke, la formule de constitution suivante :



Ce sel complexe de coloration jaune citron est accompagné de 10 à 20 p. 100 de sels complexes également ferrico-sodiques dérivés de l'acide tartrique plus riches en sodium ou plus pauvres en fer.

Pour nos expériences, les corps utilisés sont à une concentration moléculaire $5 \times 10^{-3} \text{ M}$.

Les pH sont vérifiés à l'électrode de verre.

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage par rapport à l'activité phosphatasique du tube témoin.

COMPOSITION DES DIVERS ESSAIS	TÉMOIN	I	II	III	IV
	en cm ³				
Suspension diastasique	3	3	3	3	3
Solution glycérophosphate de soude à 1 p. 100	6	6	6	6	6
Solution sulfate ferreux 0,05 M . . .	0	1	0	0	0
Solution sulfate ferrique 0,05 M . . .	0	0	1	0	0
Solution complexe ferrico-magnésium de l'acide déhydroascorbique	0	0	0	1	0
Solution complexe ferrico-sodique de l'acide tartrique	0	0	0	0	1
Eau	1	0	0	0	0
Première expérience, variations :	p. 100				
Inhibiteur —	0	+ 45	- 100	- 80	- 83
Activateur + ph 9,4					
Deuxième expérience, variations :					
pH 9	0	+ 47	- 100	- 100	- 100
Troisième expérience :					
pH 9	0		- 100	- 65	- 60

Conclusion. — On voit que le fer trivalent, soit à l'état d'ion, soit à l'état de complexe issu de l'acide déhydro-ascorbique délactonisé, ou de l'acide tartrique a un effet inhibiteur sur la phosphomonoestérase I non purifiée de ces tumeurs de rats, tandis que le fer bivalent ionisé a une action activante dans les mêmes conditions.

SUR UNE SUBSTANCE GLUCIDIQUE RESPONSABLE DE L'AGGLUTINATION DE *MORAXELLA LWOFFI* PAR LES CATIONS BI- ET POLYVALENTS

par ALICE AUDUREAU.

Nous avons décrit précédemment avec A. Lwoff (1) l'agglutination de *Moraxella lwoffi* par les cations bi- et polyvalents en milieu neutre. Les faits se présentent de la façon suivante : si à une suspension parfaitement homogène de *Moraxella lwoffi* lavée trois fois dans l'eau bidistillée, on ajoute de faibles quantités d'un sel d'un métal bi- ou polyvalent, magnésium, calcium, manganèse, baryum, etc., à pH 7,0, on

(1) A. Lwoff et A. Audureau, *Ces Annales*, 1944, **70**, 144.

provoque l'agglutination immédiate des bactéries. Les grumeaux formés peuvent subir de nombreux lavages dans l'eau bidistillée sans être dissociés. Mais si on les met en présence d'une solution neutre de phosphate, d'oxalate ou de citrate de sodium, les bactéries sont immédiatement remises en suspension. L'addition à la suspension bactérienne initiale d'un sel d'un métal monovalent, sodium, potassium, etc., reste sans effet (le sulfate d'ammonium doit être en solution saturée pour agglutiner les bactéries).

Nous avions alors émis l'hypothèse [A. Lwoff et A. Audureau (1)] que les cations se fixaient sur une substance située à la surface des bactéries entraînant la formation d'un sel, soluble dans le cas des milieux monovalents, insoluble dans le cas des métaux bi- ou polyvalents. La formation d'un sel insoluble serait responsable de l'agglutination et de la précipitation des bactéries.

La présence dans les cultures âgées de *Moraxella lwoffii*, d'une substance muqueuse enrobant les bactéries permettait de penser qu'elle était peut-être à l'origine de ce phénomène. On sait en effet que certaines substances complexes glucidiques situées à la surface des bactéries précipitent sous l'influence d'un certain nombre de sels. Nous citerons pour mémoire les polysaccharides des pneumocoques I, III, VIII qui précipitent sous l'action du sulfate d'ammonium à saturation, de l'acétate de plomb, du nitrate d'argent, du nitrate mercurique, du chlorure de baryum (2). On sait aussi que certaines bactéries donnant des cultures muqueuses, le bacille de Friedländer [Goebel et Avery (3)], certaines souches de *E. coli* [Boivin (4)], possèdent une couche muqueuse constituée également par un haptène glucidique.

La substance enrobant les Moraxelles possède des propriétés différentes. Les *Moraxella* sont en effet agglutinées par des sels qui sont sans action sur le bacille de Friedländer et sur *E. coli*. Mais il était permis de penser que la substance muqueuse des *Moraxella* présentait cependant avec les haptènes de ces bactéries une certaine analogie. Les travaux de Morgan (5) sur le bacille dysentérique, ceux de Miles et Pirie (6) sur *Brucella melitensis*, ceux de Boivin (7) sur *E. coli* ont montré en effet que les haptènes de ces bactéries présentent entre eux et avec les haplènes déjà connus des pneumocoques certaines ressemblances dans leur constitution générale.

Ces considérations nous amenèrent à tenter l'extraction de la substance muqueuse des *Moraxella* par l'une des méthodes utilisées pour la préparation des polyosides des pneumocoques. Nous avons utilisé la méthode décrite par Heidelberger, Kendal et Scherp (8), mais en maintenant toujours notre préparation à pH 7,0.

Les bactéries sont cultivées sur gélose nutritive pendant trois jours à 37°. Elles sont recueillies, lavées deux fois par centrifugation, puis

(2) R. BROWN, *J. Immunol.*, 1939, **37**, 445.

(3) W.-F. GOEBEL et O.-T. AVERY, *J. exp. Med.*, 1931, **54**, 431.

(4) A. BOIVIN, *C. R. Acad. Sci.*, 1936, **203**, 694.

(5) W.-J.-T. MORGAN, *Biochem. J.*, 1937, **34**, 2003.

(6) A.-A. MILES et N.-W. PIRIE, *Biochem. J.*, 1939, **33**, 1716.

(7) A. BOIVIN et Y. LEHOULT, *ces Annales*, 1945, **71**, 319.

(8) M. HEIDELBERGER, F.-E. KENDAL et H.-W. SCHERP, *J. exp. Med.*, 1936,

mises en suspension dans l'eau bidistillée. Elles sont laissées pendant quarante-huit heures à 37° en présence de chloroforme. Les bactéries autolysées sont alors centrifugées et le liquide surnageant précipité deux fois par l'alcool en présence d'acétate de sodium à pH 7. Le précipité est remis en solution et celle-ci est déprotéinée par agitation avec du chloroforme selon la méthode de Sevag (9). On précipite de nouveau par l'alcool, puis le précipité est dissous dans un faible volume d'eau. La solution obtenue est visqueuse et rappelle les solutions de gomme arabique. Elle est dialysée sur cellophane. Desséchée dans le vide, elle donne une poudre blanche.

Celle-ci présente les caractères suivants : pas plus que les bactéries intactes, elle n'est précipitée de ses solutions par l'addition de sels de Na, K, NH₄, etc., à concentration moyenne (M/10 à M/20). Elle est, comme les bactéries, précipitée par le sulfate d'ammonium à saturation. Les sels de Ca, Mn, Ba, Mg, la précipitent en milieu neutre. Il convient de remarquer que ce sont ces mêmes sels qui provoquent l'agglutination des *Moraxella* lavées, mises en suspension dans l'eau bidistillée. Le citrate de Mn ne précipite pas la substance extraite et n'agglutine pas non plus les bactéries (on sait que le citrate donne lieu à la formation de complexes). Elle est précipitée par l'addition de nitrate d'argent, du réactif de Millon, d'acétate neutre de plomb qui agglutinent les *Moraxella*. Elle est précipitée également par les acides sulfurique, nitrique, tannique, trichloracétique, phosphotungstique vers pH 1,5. Elle est redissoute par un excès d'acide. Il convient de remarquer que l'acide trichloracétique précipite en totalité la substance étudiée. De même lorsqu'on traite les bactéries autolysées par l'acide trichloracétique selon la méthode de Boivin, le liquide surnageant est limpide. Les *Moraxella* ne contiennent donc pas d'antigène glucido-lipidique ; elles sont d'ailleurs « Gram-négatives ».

La substance isolée donne une réaction de Molisch positive, une réaction de Bial à l'orcine, caractéristique des pentoses, positive. La réaction de Selivanoff caractéristique des cétooses est négative ainsi que celle d'Elson et Morgan caractéristique des hexosamines. La réaction de Tollens à la naphtorésorcine donne lieu à la formation d'un précipité brun violet insoluble dans le benzène, très soluble dans l'éther, ce qui semble, d'après Neuberg, être en faveur de la présence de pentoses et non d'acides uroniques.

Un échantillon de cette substance préparée à pH 4,8 contenait 11 p. 100 d'azote. Les réactions colorées des protéines, biuret et réaction à la ninhydrine sont négatives. Le réactif de Millon la précipite mais le précipité n'est pas coloré en rouge brique.

L'hydrolyse acide libère des sucres réducteurs et une quantité importante de phosphore. La réaction à la ninhydrine reste négative.

Nous avons donc isolé à partir de *Moraxella lwoffi* une substance complexe, contenant des glucides, du phosphore et une forte proportion d'azote. Cette substance semble représenter la substance muqueuse qui enrobe les bactéries âgées. Elle présente en effet des caractères de précipitation rigoureusement superposables aux caractères d'agglutination des bactéries. Ces constatations permettent de

(9) M.-G. SEVAG, *Biochem. Zeitschr.*, 1934, 273, 419.

penser que la substance isolée est bien responsable de l'agglutination de *Moraxella lwoffi* par les cations bi- ou polyvalents.

Résumé. — Nous avons isolé de *Moraxella lwoffi* une substance qui présente les caractères suivants :

1^o Elle n'est pas précipitée par les sels de Na, K, NH₄, à la concentration de M/10. Elle est précipitée par le sulfate d'ammonium à saturation.

2^o Elle est précipitée par les sels de Ca, Mn, Ba, Mg en milieu neutre — par le nitrate d'Ag, le réactif de Millon, l'acétate neutre de plomb. Elle est précipitée par tous les acides à pH 1,5 et redissoute par un excès d'acide.

3^o Elle contient des glucides réducteurs qui semblent être des pentoses, du phosphore et une quantité importante d'azote.

4^o Les sels qui précipitent la substance extraite sont ceux-là même qui agglutinent les bactéries.

5^o Il semble que l'agglutination des *Moraxella* par les cations bi- et polyvalents soit due à l'insolubilisation de la substance que nous avons isolée et qui constitue la couche muqueuse superficielle des bactéries.

(*Service de Physiologie microbienne de l'Institut Pasteur.*)

**ACTION DU DIMÉTHYLBENZOYLSULFAMIDE
SUR LE VIRUS
DE LA LYMPHOGRANULOMATOSE INGUINALE
CHEZ LA SOURIS**

par P. LÉPINE et V. PAVILANIS.

Le virus de la lymphogranulomateose inguinale se montre sensible à la plupart des préparations sulfamidées [C. Levaditi (1)]. Il existe cependant, entre les différents produits, des différences qui peuvent tenir, soit à l'action chimiothérapeutique sur le germe, soit à la tolérance du malade.

C'est pourquoi il nous a paru intéressant d'essayer comparativement aux préparations classiques un composé nouveau, le N₁-3,4-diméthylbenzoylsulfamide ou corps G. 867 (commercialisé par la maison Geigy sous le nom d'Irgafène) dont la découverte revient à Martin, Néracher et Hirt. Ce corps qui s'est signalé par une activité élective prononcée sur certains germes microbiens a l'avantage de déterminer une concentration sanguine efficace du produit sous forme libre et non acétylée, associée à une élimination lente, ce qui permet de l'administrer à doses relativement réduites, fractionnées en intervalles espacés de douze heures, fait particulièrement avantageux en clinique. Comme, d'autre part, sa faible pénétration à travers la barrière méningée, qui en accroît cliniquement la tolérance, le rend peu

(1) C. LEVADITI, *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 958.

propre à la thérapeutique des affections du névraxe, nous l'avons employé pour traiter la pneumopathie lymphogranulomateuse de la souris [R. Schœn (2)].

Nos essais ont porté sur des souris qui ont reçu par voie sous-cutanée 5 mg. de solution du sel sodique d'Irgafène (solution ayant un pH de 8,6) à la dose de 5 mg. deux fois par jour pendant quatre jours et demi, soit une dose totale de 0,045 g., très inférieure à la dose tolérée. Les souris ont été infectées par voie pulmonaire sous anesthésie au moyen de la souche de Kam de la maladie de Nicolas et Favre qui détermine ainsi chez ces animaux une pneumonie très accusée entraînant la mort d'une partie des animaux et ayant chez les survivants une évolution chronique avec persistance du virus sous forme de kyste à corpuscules de Miyagawa. Cette forme d'infection se montre particulièrement résistante à la thérapeutique. Le traitement est commencé aussitôt après l'infection.

A titre de comparaison, un lot de souris a reçu un traitement de 5 mg. de 1162 F, administré *per os* deux fois par jour, jusqu'à concurrence d'une dose totale de 0,05 g. par souris.

Toutes les souris ont été sacrifiées le sixième jour, leurs poumons examinés histologiquement, et la virulence de ces organes éprouvée par inoculation intracérébrale à 2 souris chaque fois.

Les résultats ont été les suivants :

SOURIS	NOMBRE	PNEUMONIE	PÉRIBRONCHITE	VIRULENCE du poumon
Témoins . . .	15	13	1	14
Traitées 1162 F.	10	2	7	3
Traitées G. 867.	10	1	7	0

On voit donc qu'au sixième jour après l'infection par voie respiratoire, aucune des souris traitées ne recélait plus de virus dans les poumons. 7 souris sur 10 présentaient des lésions banales de péribronchite (causées par l'irritation mécanique due au mode d'infection) destinées à rétrocéder rapidement. La seule souris présentant des lésions pneumoniques était en voie de guérison et son poumon était stérile.

Conclusion. — Le diméthylbenzoylsulfamide (composé G. 867 ou Irgafène) exerce sur la pneumopathie lymphogranulomateuse expérimentale de la souris une remarquable action stérilisante qui le rend particulièrement intéressant pour le traitement de la maladie de Nicolas et Favre.

(*Institut Pasteur.*)

(2) R. SCHOEN, ces *Annales*, 1940, 65, 336.

MICROBIOLOGIE DU SOL; UNE NOUVELLE TECHNIQUE DE MICROSCOPIE DIRECTE

par YAO-TSENG TCHAN

Depuis les travaux de Conn et de Winogradsky (1), la microscopie directe est une technique courante de la microbiologie du sol. D'abord utilisée pour la numération des germes, elle fut ensuite adaptée à l'étude de la flore totale : Winogradsky (1), impression sur lame de Cholodny et Rossi (2), examen direct de particules de terre, à faible grossissement de Kubiena et Renn (3) [ne donnant d'ailleurs de renseignement que sur les moisissures], culture sur lame en chambre humide de Cholodny (4), enfouissement dans le sol de lames gélosées de Ziemecka (5), culture sur films de gélose ensemencés avec une dilution de terre de Jones (6).

Toutes ces méthodes ont rendu et continuent de rendre de grands services ; cependant la microscopie directe, avec sa technique primitive, ne permet guère de distinguer bactéries, actinomycètes et spores de champignon en raison des multiples émulsions et centrifugations qu'elle nécessite, celles-ci rompant les filaments mycéliens ; les modifications, citées plus haut, apportées à cette technique, ne permettent guère d'étudier l'évolution de la flore en fonction de facteurs variables et toute méthode qui utilise des dilutions modifie profondément les réactions culturelles du sol.

Nous proposons une technique très simple qui permet d'éliminer la plupart de ces inconvénients :

Elle consiste à mouler de la terre dans une boîte de Petri, avec ou sans addition de substances chimiques, suivant le but que l'on se propose ; après un séjour à l'étuve à 28°, on imprime sa surface sur une lame ; l'examen microscopique se fait après fixation à la flamme et coloration par l'érythrosine phéniquée. On distingue dans le champ microscopique des colonies de bactéries généralement homogènes, des filaments d'actinomycètes et de champignons avec leurs fructifications. On peut faire les impressions sur lame à différentes reprises au cours de la culture, l'ensemble donnant un véritable film cinématographique de l'évolution de la flore.

Si on désire effectuer des dosages chimiques, il sera facile de découper une partie de la terre et de lui faire subir les traitements appropriés.

Les avantages de cette méthode peuvent être ainsi résumés :

(1) WINOGRADSKY, *Ces Annales*, 1925, **39**, 299.

(2) N. G. CHOLODNY, *Bull. Inst. Pasteur*, 1931, **29**, 662. — G. ROSSI, *Bull. Inst. Pasteur*, 1929, **27**, 547.

(3) W. KUBIENA et Ch. RENN, *Bull. Inst. Pasteur*, 1937, **35**, 432.

(4) N.-G. CHOLODNY, *Arch. Mikr.*, 1936, **8**, 236.

(5) J.-M. ZIEMECKA *Zentralb. Bakt.*, 1935, **91**, 379.

(6) JONES, Communication privée.

- 1^o La terre ne subit pas de dilutions ;
- 2^o Les bactéries, champignons et actinomycètes sont visibles sous forme de colonies très faciles à différencier ;
- 3^o L'évolution de la flore en fonction du temps et des conditions physiques et chimiques de culture est facile à suivre ;
- 4^o Les dosages chimiques peuvent être faits corrélativement avec les examens microscopiques.

Par contre, cette méthode ne permet pas une numération des germes et ne peut donner de renseignements sur la microflore anaérobiose du sol.

(*Institut Pasteur, Annexe de Garches.*)

RECHERCHES SUR LES PHENOMÈNES BIOLOGIQUES D'AMMONIFICATION DANS LE SOL

par JACQUES POCHON et YAO-TSENG TCHAN.

Si l'ammonification apparaît comme un temps essentiel du cycle de l'azote et un « fait » qui ne peut être mis en doute, il est cependant très difficile de délimiter le phénomène, d'en donner une définition précise et, actuellement, faute de techniques adéquates, de l'étudier ; aussi les opinions les plus contradictoires ont-elles été émises à son sujet.

L'azote fixé dans le sol par les bactéries fixatrices d'azote atmosphérique l'est sous forme protéique ; sous forme protéique également revient au sol l'azote des tissus végétaux et animaux à la mort des organismes ; sous forme protéique la majeure partie des engrangements apportés par l'homme.

L'ammoniaque libéré au cours des phénomènes de putréfaction des cadavres, de fermentation des fumiers est le fait de la flore de putréfaction et de la flore des fumiers, non de la flore normale du sol et ne saurait être mis au compte de l'ammonification. L'ammonification véritable ne commence que lorsque les plus grosses molécules protéiques ont été rompues, diffusent dans le sol et sont reprises par la flore zymogène de celui-ci. Ne saurait non plus être portée au compte de l'ammonification la libération d'ammoniaque par les *Azotobacter* lors des processus de fixation aérobiose ; il s'agit là d'un tout autre phénomène. L'ammonification pourrait donc être définie : la libération d'ammoniaque, à partir des molécules aminées, par la flore zymogène du sol. Mais c'est là une définition toute théorique. En effet, l'ammoniaque ainsi libéré est immédiatement repris, en partie tout au moins, par la flore hétérotrophe, pour faire la synthèse de ses protéines, et par la flore autotrophe nitrificatrice pour être oxydée en nitrates. Le seul phénomène susceptible d'être étudié et mesuré est la différence entre l'ammoniaque libéré et l'ammoniaque immédiatement réutilisé, c'est-à-dire l'ammoniaque dégagé. Ce dégagement d'ammoniaque ne se produit que lorsque la libération en est importante ou que les conditions sont défavorables à sa réutilisation. Mais souvent les réactions

de dégradation et de synthèse sont si parfaitement couplées que le stade de l'ammonification passe complètement inaperçu et qu'il ne se traduit, après un délai assez long, que par une augmentation de la teneur en nitrates.

Bien que d'une très grande importance, le phénomène de l'ammonification n'a suscité qu'un petit nombre de travaux et aucun auteur n'a réellement cherché à mettre au point des techniques satisfaisantes pour son étude. Inutile de dire que, dans ces conditions, les résultats obtenus sont peu nombreux, incomplets, souvent contradictoires.

Méthodes anciennes. — On peut à peine parler de méthodes adaptées au but poursuivi ; avec les techniques de la bactériologie courante, les auteurs isolaient du sol un grand nombre d'espèces et, parmi celles-ci, celles qui se montraient capables de libérer de l'ammoniaque à partir des protéines du bouillon étaient cataloguées ammonifiantes et supposées jouer un rôle dans le sol. De telles méthodes devaient aboutir à faire de l'ammonification un processus par bactéries absolument banales, sans aucune spécificité physiologique. En effet, l'immense majorité des auteurs considèrent que l'ammonification est le fait d'un nombre considérable de bactéries, de champignons inférieurs et d'actinomycètes agissant au sein du sol, tous ensemble. Ces auteurs ne pensent pas que l'ammonification soit un processus organisé ou, tout au moins, ils ne cherchent pas à mettre en évidence une telle organisation, une « évolution » dans ce processus. Ils ont dressé de longues listes d'espèces bactériennes, véritables catalogues, et admettent, *a priori*, le rôle effectif de celles-ci dans le sol. Sans songer à être complet, on peut citer : *B. mycoides*, *Proteus vulgaris*, *B. mesentericus*, *Sarcina lutea*, *B. subtilis*, *B. fluorescens*, *B. arborescens*, *Cephalothecium roseum*, *Aspergillus agricultor* ; des anaérobies : *B. putridus gracilis*, *B. putrificus*, *B. perfringens*, *B. bifermentans*, *B. sporogenes*. Le plus actif serait *B. mycoides*. Cependant Waksman et ses collaborateurs tentent une sorte de systématisation et admettent que l'ammonification des protéines se ferait en plusieurs étapes, avec associations microbiennes dont les unes hydrolyseraient les protéines et les autres libéreraient l'ammoniaque.

Méthodes modernes. — N'abordant qu'incidentement le phénomène de l'ammonification, S. Winogradsky imprègne quelques plaques de silicogel avec des substances organiques azotées et les ensemence avec des grains de terre ; la flore qui s'y développe est étiquetée ammonifiante. Etant donné l'extrême rapidité des pullulations microbiennes, il est indispensable de faire les examens microscopiques dix heures après l'ensemencement et la mise à l'étuve. De ces expériences Winogradsky conclut que l'ammonification dans le sol est le fait d'un petit nombre d'espèces spécialisées. Il n'a pratiquement trouvé que deux germes, à type de bacille, sur ses plaques ; la fonction ammonifiante de ces germes serait tellement développée que, en présence de matières organiques azotées, leur pullulation aurait vraiment un caractère explosif et sans concurrence possible dans le sol.

Devant ces opinions contradictoires, nous avons tenté d'élaborer un ensemble de techniques à la fois bactériologiques et chimiques qui permettent d'apporter plus de précisions dans cette étude :

1^o Etaler dans le fond de boîtes de Petri de 15 à 20 cm. de diamètre 50 g. de terre enrichie (1/1.000) de substances organiques azotées telles

que poudre de sang, poudre de trèfle séché, farine de soja, grains de blé écrasés, peptones, ou bien des substances organiques définies comme les acides aminés. Amener à 20-25 p. 100 d'humidité.

2^o Sur cette couche de terre placer, en intercalant une baguette d'agitateur coudée, une petite boîte de Petri de 5 à 6 cm. de diamètre, sans couvercle ; verser dans cette petite boîte 5 cm³, exactement mesurés, d'acide sulfurique N/50. Placer le couvercle de la grande boîte et porter à l'étuve à 28°.

3^o Chaque jour on suivra le dégagement d'ammoniaque en titrant la solution d'acide sulfurique de la petite boîte de Petri. Après titrage, cette solution sera remplacée par 5 cm³ d'une solution neuve pour le titrage du lendemain.

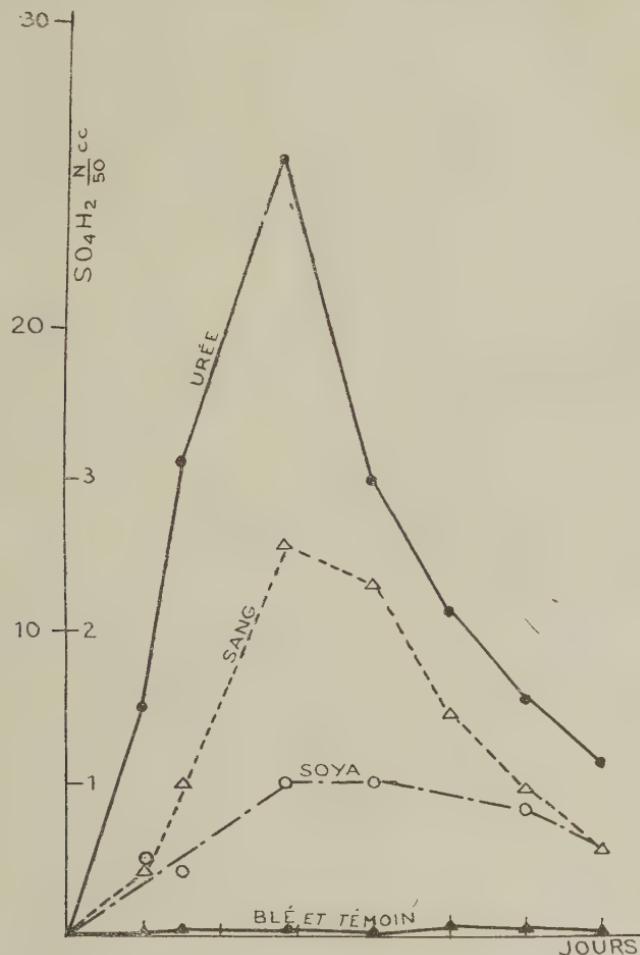
4^o Chaque jour également on suivra l'évolution de la microflore par impression sur lame ou sur lamelle : appliquer sur la surface de la terre une lame bien propre ; l'enlever délicatement, sécher, fixer, colorer avec une solution aqueuse d'érythrosine à 1 p. 100 phéniquée à 5 p. 100 (Tchan).

Il est évident que cette méthode ne donne qu'une approximation et non un titrage rigoureux de l'ammoniaque dégagé car la diffusion dans l'air de la boîte, donc la neutralisation de l'acide sulfurique, n'est pas immédiate, ni totale, d'une part, et, d'autre part, il y a des pertes lors de l'ouverture de la boîte, pertes qu'il est impossible de chiffrer. Cependant, telle qu'elle est, cette méthode permet, en portant en abscisse les temps et en ordonnées les quantités d'ammoniaque titrées, d'obtenir des courbes d'ammonification satisfaisantes. Surtout la connaissance, grâce à l'impression sur lame, du paysage microbien correspondant à chaque point de la courbe, est extrêmement instructive. On pourrait être tenté de remplacer l'impression sur lame par la microscopie directe selon la technique de Winogradsky, mais celle-ci donne, dans ce cas particulier, des résultats peu satisfaisants car le « brassage » des germes, lors des émulsions et centrifugations, fait perdre à la flore un de ses aspects les plus caractéristiques, à savoir le groupement des types morphologiques, équivalant à de véritables colonies ; la rupture, en articles multiples, des filaments d'actinomycètes rend également leur diagnostic beaucoup plus difficile.

Ces techniques nous ont montré, tout d'abord, que l'ammonification n'a pas un caractère brutal, explosif. C'est un processus qui a sa phase de latence, sa phase ascendante, son acmé, sa phase descendante, et celle-ci se poursuit très longtemps. L'acmé est d'autant plus précoce que la substance est moins complexe (urée par exemple) ; avec des substances plus complexes, comme la farine de soja, il est plus tardif et la courbe marque un plateau plus ou moins prolongé ; avec une substance telle que le grain de blé écrasé, où le rapport des protides aux glucides est extrêmement faible, le dégagement d'ammoniaque est très tardif, à peine sensible mais dure très longtemps. Il est bien évident que les processus de réutilisation interviennent alors pour une large part.

A cette évolution dans le temps correspond une évolution dans la morphologie de la flore, évolution d'ailleurs un peu variable suivant la matière organique mise à ammonifier ; en règle générale apparaissent d'abord des bactéries sporulées et non sporulées et des cocci ; vers le deuxième ou troisième jour, les actinomycètes entrent en action

et prennent une extension considérable ; cette succession correspond à la phase croissante de dégagement d'ammoniaque ; puis les moisissures envahissent la plaque vers le quatrième jour et cette date correspond le plus souvent à la phase décroissante du dégagement ; il est



vraisemblable que des moisissures réutilisent largement l'ammoniaque pour leur synthèse cellulaire.

Mais ce qui est encore plus caractéristique, c'est la répartition de cette flore, non pas dans le temps, mais, pourrait-on dire, dans l'espace, au sein du sol ; répartition dont l'impression sur lame donne une fidèle image : il ne s'agit pas d'un mélange homogène de germes variés qui recouvriraient uniformément la plaque ; des champs microscopiques entiers restent vierges ; dans d'autres on note la présence de véritables colonies qui se sont imprimées sur la lame, parfois très

volumineuses, parfois très petites ; ces colonies sont souvent à bords nets et parfaitement homogènes au point de vue de la morphologie des germes qui les constituent ; parfois, lorsque deux colonies sont voisines ou juxtaposées, les germes ne se mélangent pas. En d'autres termes, ces micro-colonies, à la surface de la terre, que révèle l'impression sur lame, présentent les caractères des colonies banales sur un milieu gélosé.

Il semble donc que ce ne soient pas toutes les bactéries du sol capables de proliférer, au laboratoire, aux dépens des substances azotées en libérant de l'ammoniaque, qui exercent une fonction ammonifiante dans le sol ; dans cette hypothèse les plaques seraient absolument couvertes de germes (étant donné le nombre de micro-organismes par gramme de terre normale) et ceux-ci ne seraient pas groupés en colonies. Cependant le nombre d'espèces en cause n'est pas aussi restreint que le laisse supposer l'hypothèse de Winogradsky.

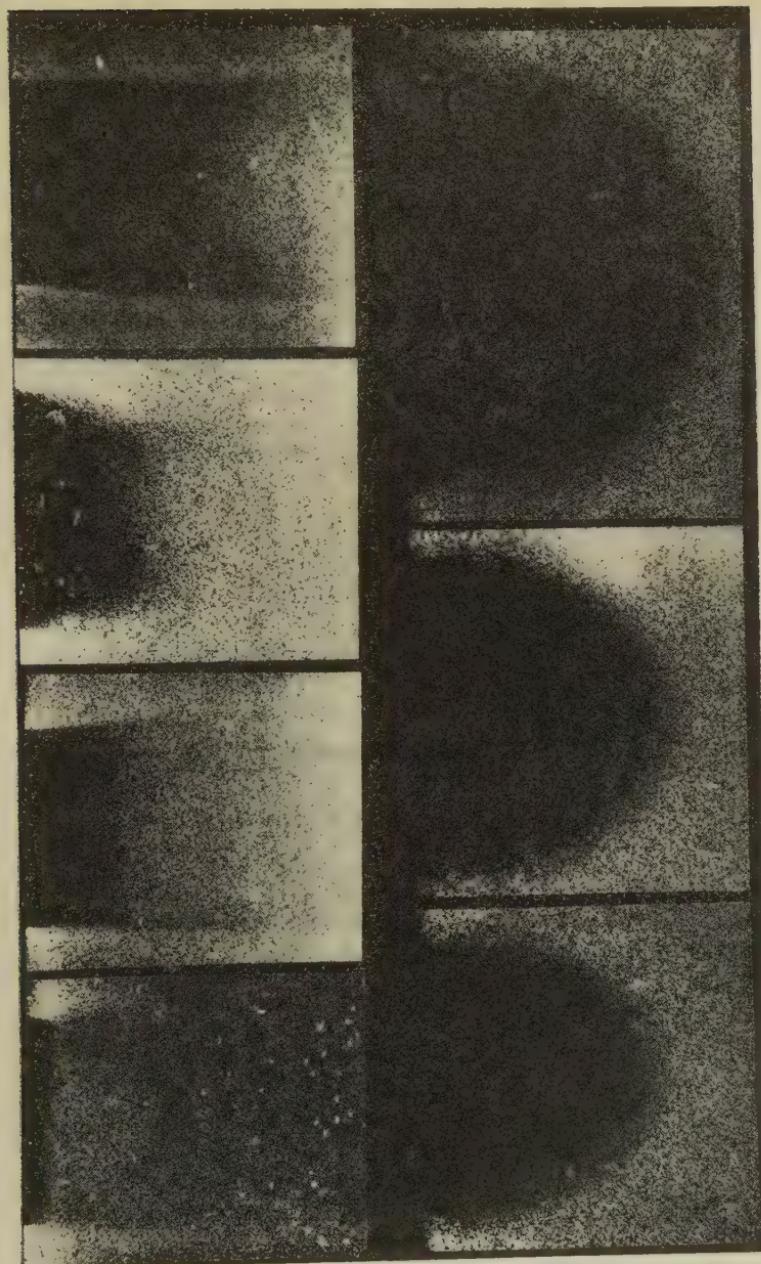
Ces résultats tendent donc à concilier les opinions assez contradictoires émises jusqu'à ce jour sur le mécanisme de l'ammonification ; il n'en reste pas moins que celle-ci est encore un des phénomènes les plus obscurs de la microbiologie du sol, mais les techniques maintenant mises au point laissent espérer la réalisation de quelques progrès dans sa connaissance.

**RADIOBIOLOGIE QUANTIQUE
ACTIONS BIOLOGIQUES COMPARÉES
DES PHOTONS X ET UV SUR LES TISSUS
ET LES CULTURES BACTERIENNES**

par MARCEL FRILLEY et MARCEL ROUYER.

Au cours d'expériences effectuées par M. Frilley, A. Lacassagne et R. Latarjet, on a comparé les actions, sur la peau de souris nouveautées, de rayons X et UV ayant sensiblement le même coefficient d'absorption dans ce tissu (1). Un des phénomènes mis en lumière a été le suivant : les lésions sont évidemment, dans les deux cas, d'autant plus importantes que les doses sont plus élevées, mais elles ne progressent pas en profondeur de la même manière. Avec les rayons X, une dose suffisante produit une destruction cellulaire *progressivement décroissante* en profondeur observée dans une épaisseur de 150 à 180 μ . Une dose plus élevée produit les mêmes effets, plus accentués. Avec les rayons UV, on observe une destruction totale d'une certaine épaisseur de tissu, laissant intacte la couche sous-jacente. Quand on augmente la dose, l'épaisseur de la couche détruite augmente, mais on passe toujours *sans transition* de cette couche superficielle nécrosée à des tissus intacts (fig. 1).

(1) A. LACASSAGNE, *Proc. Roy. Soc. Méd.*, 1946, 39, 605.



Nous avons proposé l'interprétation suivante : comme cela a été démontré pour des cellules isolées [par exemple les bacilles paradysentériques Y6R (2)], les cellules des tissus ainsi irradiés seraient tuées par l'impact d'une seule ionisation résultant de l'absorption du rayonnement X, mais la sommation de plusieurs photons UV dans la même cellule serait nécessaire pour provoquer la lésion.

Cette hypothèse permet d'interpréter exactement les résultats expérimentaux qui mettent donc en évidence *in vivo* un effet quantique de l'irradiation.

Nous avons réalisé une expérience permettant de vérifier cette hypothèse, ce qui n'était pas possible en opérant sur des tissus, où interviennent des réactions intercellulaires et dans lesquels le taux de mortalité des cellules ne peut être mesuré. Par contre, l'étude de cultures de cellules isolées permet d'établir les courbes de mortalité en fonction des doses de rayonnement. La forme de ces courbes est caractéristique du *nombre de chocs* nécessaires pour produire une lésion (3). Dans le cas du choc unique, la courbe est exponentielle. Si la sommation de n coups est nécessaire, on obtient une courbe de Poisson

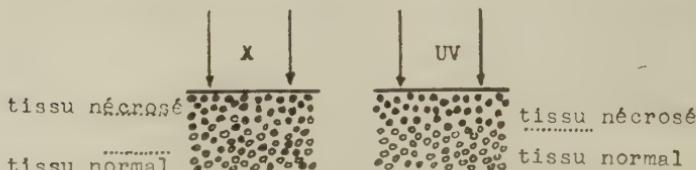


FIG. 1.

d'ordre n . On opère généralement en faisant varier les doses appliquées soit à des cultures en surface, soit à des cultures en milieu liquide dans lesquelles l'agitation permet de considérer le rayonnement comme ayant agi uniformément en profondeur, l'absorption n'apportant qu'un facteur global de réduction de la dose, facilement calculable.

En irradiant un milieu de culture ensemencé dans la masse d'une façon homogène, on peut reproduire l'expérience effectuée sur les tissus (fig. 2).

On retrouve les mêmes conditions d'absorption exponentielle du rayonnement, mais les observations biologiques deviennent précises : après un temps de culture convenable, on fait dans le milieu une coupe parallèle à l'axe du faisceau et on observe la variation, en fonction de la profondeur, de la densité des colonies issues des cellules survivantes. En outre, on peut préparer un milieu assez transparent pour que des observations macroscopiques soient possibles.

Nous avons opéré avec les mêmes sources de rayons X et UV (4) et le même bacille paradysentérique Y6R, utilisés antérieurement par Latar-

(2) L. LATARJET, ces Annales, 1943, **69**, 205.

(3) F. HOLWECK, C. R. Acad. Sci., 1929, **188**, 197. — Mme P. CURIE, *ibid.* 202.

(4) Rayonnement X d'un tube à anticathode de Mo alimenté sous 33,5 kV, et rayonnement UV d'une lampe à vapeur de Hg à basse pression.

jet (2). Ce bacille se met facilement en suspension homogène et cultive aussi bien en surface qu'en profondeur. Le milieu de culture avait, vis-à-vis des rayonnements utilisés, des coefficients d'absorption sensiblement identiques (intensité réduite de moitié dans 2 mm. environ). Il était constitué par de l'eau faiblement peptonée à 0,3 p. 100 (peptone Chapoteaut), salée à 0,5 p. 100 et gélosée à 1 p. 100.

L'eau peptonée salée est décolorée par contact de vingt-quatre heures à la glacière avec 20 g. de charbon végétal par litre. Après filtration sur papier, le milieu est ajusté à pH 7,5, la gélose est ajoutée et fondue en portant le mélange à l'ébullition, le liquide après refroidissement à 55° est collé avec deux blancs d'œufs par litre et autoclavé pendant trente minutes à 115°. Filtré ensuite à chaud sur filtre-papier préparé avec de la terre d'infusoires bien lavée, il est réparti en tubes et stérilisé à nouveau pendant trente minutes à 110°.

L'eau peptonée gélosée ainsi obtenue est incolore et transparente.

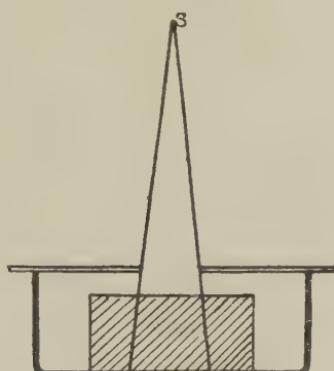


FIG. 2. — Les coupes sont faites parallèlement au plan de la figure.

Au moment de l'emploi, la gélose, fondue puis refroidie à 43°, est additionnée de 2 p. 100 de glucose et d'une quantité suffisante d'une jeune culture (cinq heures) de bacilles Y6R pour former un semis de colonies assez dense. La suspension microbienne est bien mélangée et la gélose est coulée dans des boîtes de Petri sur 2 cm. de hauteur. Après solidification, on découpe stérilement à l'emporte-pièce des cylindres de gélose de 2,5 cm. de diamètre qui sont transportés dans des boîtes de Petri vides et stériles.

Après exposition, sous un diaphragme à fente, aux rayons X ou UV et vingt-quatre heures d'incubation à 37°, le cylindre de gélose est facilement découpé en tranches minces de 1 mm. d'épaisseur, parallèlement à l'axe du faisceau de rayonnement. Ces coupes sont montées entre lame et lamelle et lutées à la paraffine.

Les photographies sur fond noir de ces préparations sont reproduites ci-contre (V. Pl.) : En haut, irradiations par rayons X, 10, 20, 40 et 80 minutes ; en bas, rayons UV, 10, 20 et 40 minutes (grossissement : trois fois). Elles montrent bien que le nombre des cellules survivantes croît progressivement, en fonction de la profondeur, dans les milieux

irradiés par les rayons X, tandis que *la séparation est nette* entre une zone stérile et une zone intacte dans les milieux soumis aux UV. Lorsqu'on augmente les doses, l'aspect des préparations n'est pas modifié, mais la transition se place à une profondeur de plus en plus grande (5).

Les courbes de mortalité sont habituellement construites avec les abscisses proportionnelles aux doses. Mais ces doses décroissent ici suivant une loi exponentielle en fonction de la profondeur. En reprenant les résultats de Latarjet (2), on peut construire les courbes figurant la mortalité de Y6R, en fonction de la profondeur, dans un milieu où l'absorption du rayonnement est exponentielle. La figure 3 montre une courbe en rayons X et une courbe en rayons U. V. ainsi transposées, correspondant à un même coefficient d'absorption dans le milieu

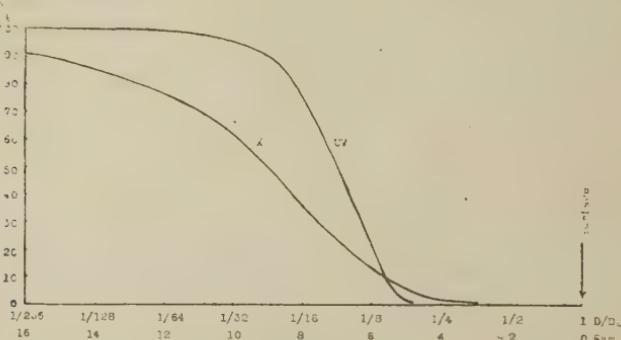


FIG. 3.

de culture (intensité réduite de moitié dans 2 mm.) et à des doses superficielles donnant un taux de survie de 10 p. 100 à la même profondeur (5,6 mm.). Elles dérivent respectivement de l'exponentielle (rayons X) et de la courbe de Poisson d'ordre 5 (rayons U. V.) obtenues par Latarjet avec Y6R. Nos résultats confirment donc les siens puisque les courbes de la figure 3 représentent convenablement les variations de la densité dans nos coupes en fonction de la profondeur.

La progression des effets des irradiations dans nos préparations a bien le même aspect que dans les tissus de souris nouveau-nées (1) et l'interprétation que nous proposons de ces résultats *in vivo* se trouve ainsi justifiée.

(5) La sensibilité de Y6R au rayonnement ayant déjà été étudiée, nous n'avons cherché ici qu'à obtenir l'illustration d'un phénomène, sans apporter de mesures précises et en négligeant certaines précautions qu'elles auraient exigées : égalisation exacte des coefficients d'absorption du milieu de culture relatifs aux deux rayonnements utilisés, élimination des effets de diffusion, etc.

**EMPÊCHEMENT DE LA BACTÉRIOPHAGIE
PAR UN ANTISEPTIQUE : PHÉNOMÈNE DE L'ANNEAU
DE COLONIES INTACTES EN MILIEU CONTAMINÉ
PAR LE BACTÉRIOPHAGE**

par PIERRE NICOLLE.

Déposons au centre d'une boîte de gélose à 1,5 g. p. 100, 1 goutte d'une dilution de formol et attendons que cette goutte soit entièrement

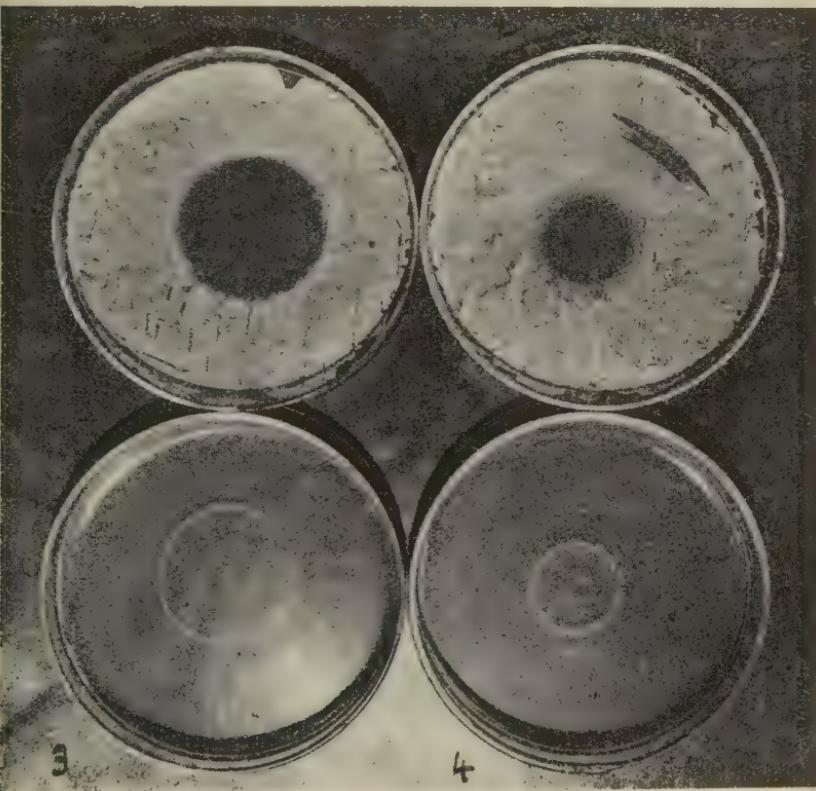


FIG. 1.

absorbée par le milieu. Ensemencons alors la surface de la gélose avec une suspension assez dense de staphylocoque Twort (*Staph. albus*). Après quelques heures d'étauve, la culture bactérienne s'est développée en nappe continue partout où le formol n'a pas exercé son action germicide. Au centre de la boîte, s'observe donc un espace nu débor-

dant plus ou moins les limites initiales de la goutte suivant que la concentration de formol avait été plus ou moins forte. À la lisière de la couche bactérienne, c'est-à-dire juste en dedans de la zone où la culture présente encore une épaisseur normale, siège une étroite marge circulaire de 1 à 1,5 mm. constituée par de minuscules colonies d'autant plus espacées les unes des autres qu'elles sont plus voisines de l'espace dénudé central. Cette culture discontinue est manifestement due à ce que, à cet endroit, les concentrations du formol diffusé à travers la gélose ont subi, du centre vers la périphérie, une dégradation rapide. Les doses limites d'antiseptiques ont laissé subsister quelques germes qui ont donné naissance à ces colonies isolées (Fig. 1 Photos 1 et 2).

Recommençons la même expérience, mais cette fois ajoutons à la suspension bactérienne I goutte de bactériophage staphylococcique Twort et étalons le mélange sur toute la surface de la boîte. Après incubation, le centre présente l'aspect dénudé décrit dans l'expérience précédente et la périphérie ne montre, elle non plus, aucune trace de culture, ce qui est normal, puisque partout où le développement du staphylocoque n'a pas été entravé par le formol, le germe a subi l'effet lytique du bactériophage, et nous savons que le bactériophage staphylococcique Twort agissant sur la souche correspondante donne toujours, dans les conditions de l'expérience, une lyse totale et définitive, c'est-à-dire sans cultures secondaires. La boîte ne devrait donc présenter aucune trace de culture. Il n'en est pas tout à fait ainsi. En examinant attentivement la surface de la gélose en lumière réfléchie, dès la dix-huitième heure on voit se former, à la limite des zones d'influence respective du formol et du bactériophage, une sorte d'anneau dépoli. Après vingt-quatre heures et surtout après quarante-huit heures, cet anneau se montre nettement constitué par de petites colonies (Photos 3 et 4). Par la suite, ces colonies grandissent et en certains endroits, peuvent devenir confluentes et former un cercle continu. Le diamètre

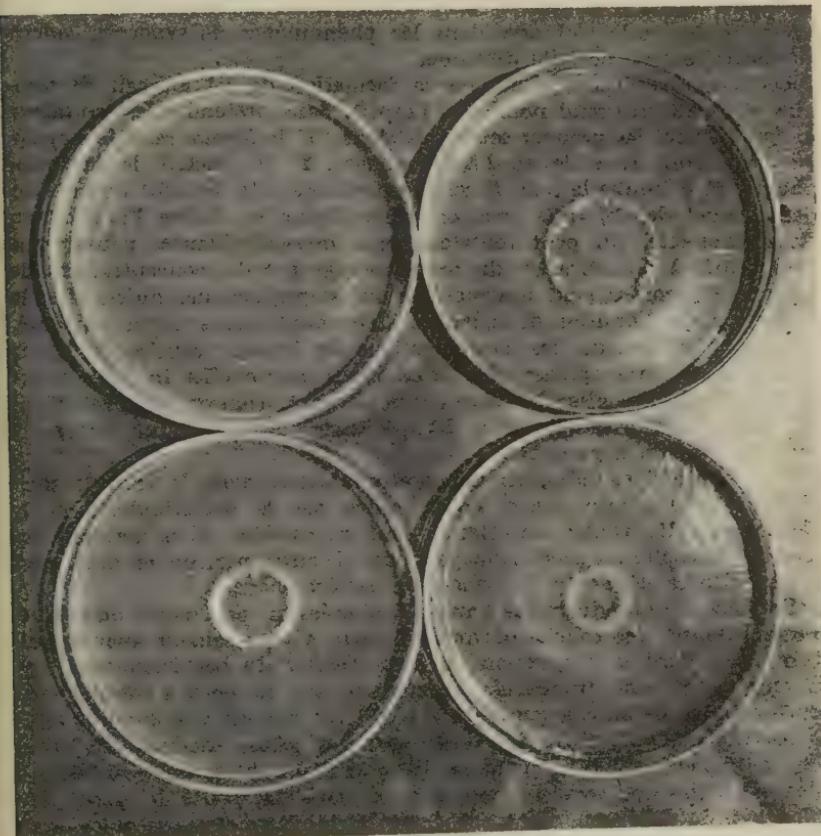
DILUTIONS du formol à 30 p. 100	BOITES ensemencées avec le staphylocoque seul.		BOITES ENSEMENCÉES AVEC LE STAPHYLOCOQUE additionné de bactériophage Twort		
	Diamètre de l'espace dépouillé en centimètres	Diamètre externe de l'anneau	Diamètre interne de l'anneau	Epaisseur de l'anneau	
1 : 20	2,1	1,9	1	0,45	
1 : 15	2,2	1,4	1,6	0,4	
1 : 10	2,7	2,6	2	0,3	
1 : 5	3,3	3,2	2,7	0,25	
1 : 3	3,7	3,6	3,4	0,1	
1 : 2	5,2	5,3	5,2	0,05	
Pur	6,25	Pas d'anneau de colonies.			

interne de l'anneau varie, comme nous avons vu varier le diamètre de l'espace dépouillé formolique, avec les concentrations de l'antiseptique (Fig. 2. Photos 5, 6, 7 et 8).

L'épaisseur de l'anneau, de 3 à 4 mm. pour les faibles concentrations de formol (1/20), devient d'autant plus mince que celles-ci augmentent. Elle est réduite à un seul rang de colonies pour le formol au 1/5. Lorsque l'anneau est épais, sa structure n'est pas homogène. A la périphérie, les colonies, plus ou moins confluentes, sont anguleuses, échan-

5

6



7

8

FIG. 2.

crées. Elles présentent des irrégularités dans leur translucidité, avec des alternances de régions normales et de régions plus claires. Bref, ce sont des colonies plus ou moins atteintes par la lyse bactériophagique. Vers le centre, au contraire, les colonies sont nettement isolées les unes des autres, rondes, intactes et elles ne diffèrent des colonies de staphylocoque normal que par leur taille qui est petite.

Le formol n'est pas le seul antiseptique capable de donner le phéno-

mène. Le sublimé, l'acide phénique le provoquent également, mais il semble que les antibiotiques, comme les sulfamides, la pénicilline ne le permettent pas (1).

Le développement du staphylocoque, dans les conditions exposées ci-dessus, est assez inattendu. Pris « entre deux feux », pourrait-on dire le formol d'un côté, le bactériophage de l'autre, logiquement le germe aurait du n'avoir aucune chance de survivre. Il est intéressant de souligner qu'ici, les deux agents, séparément nocifs pour le staphylocoque, lorsqu'ils agissent ensemble, loin d'additionner ou de renforcer leurs effets, comme cela s'observe dans les phénomènes de synergie, voient au contraire leur nocivité diminuer.

Les hypothèses pour expliquer la formation de cet anneau de colonies viennent en grand nombre à l'esprit. Sans prétendre les énumérer toutes, on peut les grouper sous trois chefs : 1^o le formol rend le staphylocoque moins sensible au bactériophage ; 2^o il inactive le bactériophage ; 3^o il inhibe la lyse. Il serait prématûr actuellement de préciser dans lequel de ces trois groupes d'hypothèses se trouve l'explication du phénomène. On peut toutefois, sans invraisemblance, penser qu'il est plutôt à l'inactivation du bactériophage par des concentrations de formol non entièrement destructrices du staphylocoque, qu'il est due à la formation de l'anneau de colonies. Cependant, nous avons constaté, qu'en milieu liquide, les concentrations de formol insuffisantes pour empêcher le développement bactérien n'ont aucun effet inhibiteur sur la bactériophagie. Elles la retardent seulement, comme elles retardent la culture du staphylocoque. L'expérience suivante vient encore à apporter un fort argument :

On prélève 6 colonies, en apparence intactes, dans la zone la plus centrale de l'anneau d'une boîte traitée par le bactériophage et le formol au 1/15. Toutes ces colonies sont repiquables. Elles donnent des souches sensibles au bactériophage Twort. D'autre part on ne peut dans leurs cultures déceler la présence du bactériophage.

De deux colonies du même anneau, prélevées un peu moins au centre, l'une a donné une souche normale. L'autre n'a pu fournir aucune culture, mais dans la suspension on a pu déceler du bactériophage. Une colonie ayant une minuscule échancrure sur le bord a donné une culture normale en eau peptonée, mais il n'a pas été possible d'obtenir à partir de cette culture des repiquages sur gélose inclinée. Le filtrat de la culture en eau peptonée contenait du bactériophage. Enfin, deux colonies en voie de lyse, situées dans la partie la plus périphérique de l'anneau, n'ont pas donné de culture, mais la suspension filtrée contenait du bactériophage. On voit donc que, plus les colonies sont situées vers le centre, plus grandes sont leurs chances d'être exemptes de contamination bactériologique.

En dehors de l'intérêt théorique que pouvait présenter cette curiosité de laboratoire, nous lui avons reconnu une utilisation pratique. Il arrive souvent qu'on ait à tenter l'isolement de bactéries en milieu contaminé par du bactériophage. Des nombreux moyens couramment

(1) Cependant, JONES et SCHUTZ (*J. Bact.*, 1946, **52**, 327), dans un travail récent sur les substances antiphages produites par certains actinomycètes ou certains champignons, décrivent un phénomène qui présente une certaine analogie avec celui qui est provoqué par le formol.

employés, l'emploi du serum antiphage est certainement l'un des plus efficaces. Malheureusement, la préparation d'un tel serum est longue. Chaque serum antiphage est spécifique. Les bactériophages sont d'autre part en nombre infini. Il peut arriver qu'on ne dispose pas au moment utile du serum antiphage voulu. Le phénomène de l'anneau doit permettre d'isoler en toutes circonstances un germe contaminé par n'importe quel bactériophage (2).

Résumé. — Lorsqu'on ensemence, sur une boîte de gélose ayant préalablement reçu une goutte de formol dilué ou d'autre antisептиque, un germe en présence d'un bactériophage actif, il se forme, aux confins de la zone d'inhibition due à l'antiseptique, un anneau de colonies du germe sensible, malgré la présence du bactériophage. Cette culture paradoxale est due, semble-t-il, au fait qu'à cet endroit, la bactérie, sous l'influence d'une concentration limite de formol, se développe encore, alors que le bactériophage est inactivé. La formation d'un anneau de colonies, dont beaucoup sont indemnes de bactériophage, peut être utilisée, dans la pratique, pour l'isolement, d'un germe en milieu contaminé par du bactériophage.

ACTION DU DDT ET DE L'HEXACHLOROCYCLOHEXANE SUR LES BACTÉRIES DES MATIÈRES STERCORALES

par E. ROMAN, P. POULAIN et E. RINAUDO.

L'activité sur les bactéries des insecticides de synthèse semble avoir donné lieu à peu de recherches ; cependant, G. Drouineau, P. Gouny et T. Lahaye ont présenté au XX^e Congrès de Chimie industrielle (Paris, 1946) une communication documentée sur l'action du DDT et de l'hexachlorocyclohexane sur les microbes du sol. Pour utiliser, sans inconvénients, l'effet larvicide de ces substances dans les fosses septiques, il est nécessaire qu'elles ne nuisent pas à l'activité des micro-organismes liquéfiant des matières stercorales.

Nous l'avons déjà (1945) démontré indirectement, en constatant le fonctionnement normal d'installations traitées par les épreuves de putrescibilité et au bleu de méthylène. Nous avons néanmoins réalisé des essais directs, en profitant à saturation de la faible solubilité dans l'eau du DDT et de l'hexachlorocyclohexane technique ; nous avons aussi utilisé des suspensions de ces substances à 1 p. 200.000, taux au moins décuplés de la dose larvicide moyenne, obtenues à l'aide de solutions à 0,5 p. 100 dans l'alcool à 95° ou d'émulsionnants huileux.

Nous n'avons expérimenté sur les anaérobies qu'avec des insecticides émulsionnés. Le pouvoir antiseptique a été étudié, en diluant 1 cm³

(2) KLIBLER, OLENIK et CZAKES (Am. J. Publ. Health, 1943, 33, 682) ont proposé l'emploi du formol pour l'isolement du bacille dysentérique dans les selles contaminées par du bactériophage.

de sewage dans 40 cm³ de suspensions, puis en ajoutant après quarante-huit heures I goutte de ces liquides à 10 cm³ d'eau distillée ; nous avons alorsensemencé en gélose de Veillon I goutte de cette deuxième dilution ; pour le pouvoir empêchant, nous avonsensemencé dans le même milieu additionné des substances à essayer I goutte de sewage pur, puis I goutte d'une dilution de vingt-quatre heures d'I goutte du produit septique dans 10 cm³ d'eau distillée.

Nos essais sur les aérobies ont été effectués avec des solutions saturées et des émulsions. Dans le cas du pouvoir antiseptique, nous avonsensemencé sur gélatine peptonée en boîte de Petri soit II gouttes d'une dilution de vingt-quatre heures d'I goutte de sewage dans 10 cm³ de suspensions insecticides, soit I ou II gouttes du liquide obtenu par addition extemporanée d'I goutte de la première dilution à 10 cm³ d'eau distillée ; pour le pouvoir empêchant, nous avons porté sur des milieux semblables, mais traités par nos insecticides, soit directement I goutte de sewage, soit II gouttes d'une dilution de vingt-quatre heures avec I goutte de produit septique et 10 cm³ d'eau distillée.

Les cultures ainsi obtenues ont été le plus souvent aussi développées que les témoins ; même, dans plusieurs cas, nous avons vu plus de colonies après traitement ; ainsi, dans un essai d'anaérobies, nous avons après cinq jours compté 2 colonies sur Veillon contre 10 et 20 dans les tubes au DDT et à l'hexa ; dans une expérience en aérobiose, il n'a été vu, après trois jours, aucune colonie sur le témoin, mais 100 et plus de 1.000 après action de l'hexa et du DDT.

Nous avons encore recherché si nos insecticides n'auraient pas l'avantage de détruire les germes du groupe coli-typhiue et nous avons étudié les pouvoirs antiseptique et empêchant de nos suspensions insecticides vis-à-vis de souches de coli et de para B communiquées par notre ami P. Sédallian. A cet effet, nous avonsensemencé sur gélatine peptonée, additionnée ou non, suivant le cas, d'insecticides, I et II gouttes d'une dilution de vingt-quatre heures, préparée en ajoutant à 10 cm³ d'eau distillée, pure ou traitée par les mêmes substances I goutte d'une émulsion d'opalescence type séro-diagnostic de cultures de quarante-huit heures sur gélose des bacilles à essayer.

Ici encore, les bactéries soumises aux insecticides ont poussé au moins aussi bien que les témoins ; même dans les divers essais du coli, il a été vu après trois et quatre jours des colonies confluentes avec le DDT et ne dépassant pas 15 avec l'hexa et sur le témoin. Tous ces essais, réalisés à une température d'environ 20°, prouvent que de fortes doses de DDT et d'hexa sont sans action, dans le milieu extérieur, sur les bactéries intestinales, mais ne gênent en rien l'activité des microbes des fosses septiques ; elles semblent même parfois stimuler leur croissance, comme si, conformément aux expériences de Biernacki citées par R. Dujarric de la Rivière (1925), les concentrations essayées se rapprochaient de la dose antiseptique minima. Pour la lutte anti-moustiques, on peut donc, sans inconvénient, traiter ces installations par du DDT ou de l'hexa à 1 p. 200.000 et, à plus forte raison, par des concentrations larvicides moyennes, beaucoup plus faibles.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Sur le rôle du sérum dans le développement de « *Moraxella lacunata* » et de « *Neisseria gonorrhæ* », par André LWOFF.

Etude de la virulence des bacilles tuberculeux jeunes, par L. NÈGRE.

Séance du 6 mars 1947.

Présidence de M. GASTINEL.

NÉCROLOGIE

FREDÉRIC NITTI

(1905-1947)

Le devoir que je remplis aujourd'hui est un des plus pénibles qui soient.

En tant que Directeur de l'Institut Pasteur je déplore profondément la disparition d'un Chef de Service qui a rendu à notre Institut des services exceptionnels et qui, étant donné son âge, devait pendant de très longues années encore contribuer à la gloire de notre Maison.

Mais pour moi Frédéric Nitti représentait beaucoup plus encore : il était mon ami. Pendant six ans nous avions constamment travaillé l'un à côté de l'autre, partageant les mêmes espérances puis les mêmes joies. C'est dès 1935, en effet, qu'il commença à assurer la liaison entre notre Laboratoire de chimie et le Laboratoire de bactériologie de M. Salimbeni dont il était depuis deux ans l'élève très cher. La passion qu'il apportait à ses recherches ne pouvait être soupçonnée que par les témoins très intimes de sa vie de tous les jours, ceux qui savaient que, sous un aimable sourire d'ironie, se dissimulaient soigneusement ses tumultueux sentiments de chercheur.

Lorsque nous avons dû, en 1941, interrompre notre collaboration de chaque jour, le sacrifice a été le même pour chacun de nous deux. J'ai continué à suivre ses travaux, et lui n'a jamais cessé de m'aider à résoudre les problèmes nouveaux qui se présentaient à chaque pas devant nous durant cette période hérissée non seulement des difficultés propres à l'occupation mais aussi des complications qui n'ont fait que s'accroître et qui nous accablent à l'heure actuelle.

Son optimisme souriant, son calme courage, son mépris total du

danger, son intuition, son intelligence, ses inépuisables connaissances bactériologiques : il a tout offert pour servir l'Institut Pasteur et la France qu'il avait choisie pour patrie dès 1939.

Il commanda l'équipe des six hommes qui assurèrent le fonctionnement du dépôt des médicaments clandestins que le Professeur Vallery-Radot nous avait demandé de monter à l'Institut Pasteur ; dépôt qui se transforma rapidement en Pharmacie Centrale des Forces françaises de l'Intérieur. Il connaissait tous les risques que comportait un tel poste mais rien ne pouvait freiner son enthousiasme à servir la Résistance : une médaille l'en a récompensé en 1945.

Il y a quatre mois à peine une nouvelle distinction honorifique venait encore resserrer les liens affectueux qui l'unissaient à nous : la Légion d'honneur lui était décernée pour sa participation à la découverte des propriétés thérapeutiques du sulfamide. Ce fut une de ses dernières joies, une joie profonde, car son attachement au Laboratoire était sans limite : il ne pouvait concevoir une autre activité que celle qu'il exerçait depuis douze ans à l'Institut Pasteur et ses dernières lettres révélaient une impatience grandissante de reprendre ici sa place.

Ceux qui ont réellement connu Frédéric Nitti ne se consoleront jamais de ne plus espérer son retour ; la peine de ses collaborateurs et en particulier du plus ancien d'entre eux, son cher Fernand Boyer, prouve quel homme et quel chef il a été. Il a su également être un fils, un mari et un père d'une émouvante perfection, et nous pouvons mesurer l'étendue des douleurs qu'il laisse derrière lui.

Que tous les siens sachent que nous comprenons et que nous partageons leurs sentiments qui rejoignent les nôtres.

Nous apprenons qu'hier, à Rome, un émouvant hommage a été rendu à son œuvre scientifique et à sa personnalité morale dans une séance commémorative à l'Institut Supérieur de Santé au cours de laquelle ont pris la parole, en particulier, le Professeur Marotta et le Professeur Chain.

Jacques TRÉFOUËL.

Le Gérant : G. MASSON.